UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEINBINDUNG UND VERTEILUNG VON POLYCHLORIERTEN BIPHENYLEN UND CHLORKOHLENWASSERSTOFF-INSEKTIZIDEN IM SÄUGETIERORGANISMUS

Erhard Deml

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551925_0062

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEINBINDUNG UND VERTEILUNG VON POLYCHLORIERTEN BIPHENYLEN UND CHLORKOHLENWASSERSTOFF-INSEKTIZIDEN IM SÄUGETIERORGANISMUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Erhard Deml
aus München

München, 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.H. Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof.Dr.B. Linzen

Tag der mündl. Prüfung: 14. November 1975

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Toxikologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr.W. Rüdiger danke ich für sein Entgegenkommen, diese Arbeit außerhalb seines Instituts bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung durchführen zu können und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F. Korte danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Institut für ökologische Chemie der GSF, München.

Danken möchte ich auch Herrn Prof.Dr.H.Greim, Herrn Dr.H.Rohleder, Herrn Dr.P.Spitzauer und Herrn Dr.Th.Wolff für wertvolle Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie Frau S.Holzinger für technische Mitarbeit.

Herrn Prof. Dr. G.Lange +

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	1
1.	Polychlorierte Biphenyle	1
1.1.	Synthese	2
1.2.	Nomenklatur	2
1.3.	Physikal. und chem.Eigenschaften	3
2.	Vorkommen in der Umwelt	3
2.1.	Anwendungsbereiche	3
2.2.	Ursachen und Mechanismen der Verbreitung	4
2.3.	Vorkommen in der unbelebten Umwelt	4
2.4.	Vorkommen in der Biosphäre und Anreicherung in Nahrungsketten	4
2.5.	Rückstände im menschlichen Körper	5
3.	Toxikologie	5
3.1.	Akute Vergiftungen beim Menschen	5
3.2.	Allg. Toxizität	5
3.3.	Wirkung auf Enzymsysteme der Leber	6
4.	Pharmakokinetik und Metabolismus	6
4.1.	Resorption und Verteilung im Organismus	6
4.2.	Pharmakokinetik von PCB's	7
5.	Metabolismus von PCB's	8
6.	Chlorkohlenwasserstoffinsektizide	8
B	ZIELSETZUNG	9
1.	Zielsetzung	9
2.	Auswahl der untersuchten Verbindungen	10

C	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	13
I.	Material und Methoden	13
1.	Allg. Analytik	13
1.1.	Verwendete Lösungsmittel u. Chemikalien	13
1.2.	Prüfung der Reinheit und Nachreinigung von Lösungsmitteln	14
1.3.	Reinigung von Laborgeräten	15
1.4.	Gaschromatographie	15
1.4.1.	Quantitative Bestimmung	15
1.5.	Extraktion von PCB's aus wässrigen Lösungen	16
2.	Messung der Proteinbindung	17
2.1.	Gleichgewichtsdialyse	17
2.2.	Bestimmung der Löslichkeit	19
2.3.	Gelfiltration	19
3.1.	Verteilung von PCB's im Blut	20
3.2.	Elektrophorese	21
4.	Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten	23
5.	Perfusion der isolierten Leber von Ratten	23
5.1.	Aufbau der Apparatur	23
5.2.	Präparation der Leber	25
6.	Kinetik der Verteilung und Ausscheidung von 2,2'-DCB bei Ratten	25
6.1.	Extraktion von 2,2'-DCB aus tierischen Geweben	27
6.2.	Clean-up	27
II.	Ergebnisse	29
1.	Bindung von PCB's an Rinderserumalbumin	29
2.	Gelfitration	33
3.	Bindung von 2,2'-DCB an Serumglobuline	39
4.	Elektrophorese	41

5.	Verteilung von PCB's im Blut	42
6.	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten	49
7.	Kinetik der Verteilung und Ausscheidung von 2,2'-DCB bei Ratten	49
7.1.	Blutspiegelkurve und Halbwertszeit	49
7.2.	Organverteilung	52
7.3.	Nachweis der Metaboliten von 2,2'-DCB	55
8.	Aufnahme in die isoliert perfundierte Leber	58
D	DISKUSSION	61
1.	Proteinbindung	61
1.1.	Bestimmung der Proteinbindung	61
1.2.	Gleichgewichtsdialyse	63
1.3.	Bestimmung der Löslichkeit	64
1.4.	Gelfiltration	64
1.5.	Albuminbindung von PCB's	66
1.6.	Globulinbindung von 2,2'-DCB	66
1.7.	Elektrophorese	68
1.8.	Bindung an Rinderplasma	69
1.9.	Konkurrenz u. Verdrängung aus der Proteinbindung	69
2.	Vergleich mit früheren Untersuchungen	71
3.	Verteilung von PCB's im Blut	74
3.1.	Verteilung zwischen Blutzellen u. Plasma	74
3.2.	Konzentrationsabhängigkeit d. Verteilung	74
3.3.	Proteinbindung u. Verteilung im Blut	75
4.1.	Lipophilie von PCB's	76
4.2.	Elimination aus dem Blut	76
5.	Pharmakokinetik von 2,2'-DCB	78
5.1.	Blutspiegelkurve	78
5.2.	Organkonzentration u. Verteilung im Organismus	80
5.3.	Maßgebliche Faktoren für die Kinetik der Elimination	81
6.	Metabolismus von 2,2'-DCB	83
E	ZUSAMMENFASSUNG	84
F	LITERATURVERZEICHNIS	86

A Einleitung

In den letzten Jahren haben zahlreiche Untersuchungen die zunehmende Verbreitung von anthropogenen Fremdstoffen in der Umwelt gezeigt (Coulston u. Korte,1972). Obwohl eine unmittelbare Gefährdung des Menschen bisher nur in Ausnahmefällen nachgewiesen werden konnte, besteht über die Notwendigkeit einer eingehenden toxikologischen Prüfung dieser Stoffe kein Zweifel.
Unter den organischen Verbindungen, die zur Belastung der Biosphäre beitragen, nehmen die chlorierten Kohlenwasserstoffe wegen ihrer Persistenz und vergleichsweise hohen chronischen Toxizität eine Sonderstellung ein (Robinson,1970). Die Untersuchung von Verbindungen mit insektizider Wirkung, wie DDT, stand seit den fünfziger Jahren im Vordergrund (Rosen u. Craybill,1966).
Nachdem Jensen (1966) in schwedischen Wildtierproben eine weitere Gruppe von bis dahin unbekannten Umweltchemikalien als polychlorierte Biphenyle (PCB's) identifizieren konnte, wurden die Verbreitung und die toxischen Eigenschaften dieser Verbindungen sehr eingehend untersucht.

1. Polychlorierte Biphenyle

Polychlorierte Biphenyle wurden 1881 erstmals beschrieben (Schmidt,1881). Seit 1929 werden sie industriell hergestellt (Penning,1930).
Die Jahresproduktion in den USA stieg in der Zeit von 1960 bis 1970 von 19 000 auf 43 000 Tonnen p.a. (Anon.,1971). Die Weltproduktion von 1930 bis 1970 wird auf rund 10^6 Tonnen geschätzt (Interdep.Task Force on PCB's, 1972).
Seither sind Verbrauch und Produktion zurückgegangen, da polychlorierte Biphenyle in den USA und der BRD von den Herstellern nur noch für die Verwendung in geschlossenen Systemen, z.B. Transformatoren und Hydraulikanlagen, bei denen der Verbleib weitgehend kontroliert werden kann, abgegeben werden (Interdep.Task Force on PCB's,1972).

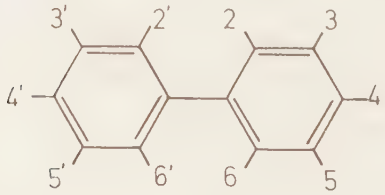
1.1. Synthese

Die industrielle Herstellung von PCB's erfolgt durch Chlorierung von Biphenyl unter Verwendung von Katalysatoren (Vollmann, 1954). Bei der wenig spezifischen Reaktion entstehen zahlreiche Isomere und Chlorhomologe. Die handelsüblichen Produkte enthalten daher 60 - 80 Einzelkomponenten (Sissons u. Welti,1972).
Daneben wurden chlorierte Dibenzofurane und Chlornaphthaline als Verunreinigungen nachgewiesen (Vos,1970).
Der durchschnittliche Chlorgehalt der technischen Gemische beträgt zwischen 21 und 68 Gewichtsprozent.
Reine definierte Isomere und Chlorhomologe für toxikologische Untersuchungen können nach verschiedenen Verfahren (Hutzinger,1971, Hustert,1972) dargestellt werden.

1.2. Nomenklatur

Die gemeinsame Grundstruktur der polychlorierten Biphenyle ist das Biphenylmolekül, bei dem die zehn vorhandenen Wasserstoffatome teilweise oder vollständig durch Chloratome ersetzt sein können (Abb.1). Theoretisch sind 209 Chlorhomologe und Stellungsisomere möglich. Polychlorierte Biphenyle kommen unter folgenden Bezeichnungen in den Handel: "Clophen" (Bayer,BRD), "Aroclor" (Monsanto,USA,Kanada, Großbritannien), "Phenoclor" (Prodelec,Frankreich und "Kanechlor" (Japan). Daneben werden sie in Italien, Spanien und verschiedenen Ostblockländern hergestellt.

Abb.1 Grundstruktur der polychlorierten Biphenyle



1.3. Physikal. und chem. Eigenschaften

Die Handelsprodukte sind farblose oder leicht gelbliche, ölige Flüssigkeiten, deren Viskosität mit steigendem Chlorgehalt zunimmt. Reine Isomere und Chlorhomologe, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind im Gegensatz dazu bei Raumtemperatur fest und liegen als farblose oder weiße Kristallnadeln oder -plättchen vor.
Der Dampfdruck ist niedrig, die Siedebereiche liegen zwischen 275 und 450°C. Die höherchlorierten Gemische sind nicht brennbar. Die thermische Zersetzung erfolgt erst oberhalb 800°C (Müller,1974).
Gegenüber verdünnten Säuren und Laugen sind die PCB's beständig.
In Wasser sind sie kaum löslich (unter 1 mg/l bei 25°C), dagegen gut löslich in unpolaren Lösungsmitteln.
Unter den physikalischen Eigenschaften sind vor allem der große spezifische Durchgangswiderstand und die hohe Dielektrizitätskonstante von Bedeutung (Bayer AG, 1969).

2. Vorkommen in der Umwelt

2.1. Anwendungsbereiche

Die Hauptanwendungsgebiete der polychlorierten Biphenyle liegen im technischen Bereich (Hutzinger,1972).
In der Elektroindustrie werden sie als Isolier- und Kühlflüssigkeit für Transformatoren und als Dielektrikum beim Bau von Kondensatoren verwendet (Broadhurst,1972).
In der Lack- und Kunststoffindustrie werden sie als Weichmacher sowie als flammhemmende und wasserabweisende Zusätze zu Kunstharzlacken und verschiedenen Kunststoffen, wie PVC,PVA, und Polystyrol zugesetzt (Monsanto,1967).
Druckfarben (Anon.,1971), kohlefreies Kopierpapier (Masuda,1972) und Innenwandverkleidungen für Futtersilos (Skrentny,1971) können ebenfalls PCB's enthalten. Daneben werden sie als Schmiermittel für Kompressoren und Hochdruckpumpen und als Hydraulikflüssigkeiten eingesetzt.
Mehrfach wurde vorgeschlagen, PCB's als Zusatz zu Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden zu verwenden, da eine Verlängerung der Wirkungsdauer

flüchtiger Insektizide, wie Lindan, bei gleichzeitig erhöhter Toxizität festgestellt wurde (Hornstein u. Sullivan,1953). Ob dieser Vorschlag jemals verwirklicht wurde, ist nicht bekannt.

2.2. Ursachen und Mechanismen der Verbreitung

Es wird angenommen, daß PCB's vor allem durch Industrieabfälle, -abwässer und -abgase in die Umwelt gelangen (Holden,1970, Schmidt,1971). Kommunale Abfälle (Müll und Klärschlamm) enthalten ebenfalls PCB-Rückstände (Müller,1973). Daneben besteht die Möglichkeit eines Übertritts von PCB's aus Verpackungsmaterialien bzw. PCB-haltigen Kunststoffen durch Verdampfung bzw. Auslaugen.
Der Austausch zwischen Boden und Gewässern bzw. der Atmosphäre erfolgt durch Verdampfung, Adsorption und Desorption (Müller,1973). Die Verbreitung in der Umwelt erfolgt durch Luft- und Wasserströmungen, wobei die PCB's vermutlich weitgehend an Staubpartikel in der Atmosphäre (Södergren,1972) bzw. Schwebstoffe im Wasser adsorbiert sind.

2.3. Vorkommen in der unbelebten Umwelt

PCB's wurden in der Atmosphäre und in Regenwasser (Risebrough,1968, Tarrant,1968, Nisbet,1972) und in Oberflächengewässern (Duke, 1970, Södergren,1972, Selenka,1972) nachgewiesen. In Klärschlamm und Hausmüll fand man (Müller, 1974) ebenfalls beträchtliche Rückstände.

2.4. Vorkommen in der Biosphäre und Anreicherung in Nahrungsketten

Wasserlebende Organismen nehmen PCB's mit der Nahrung und aus dem Wasser auf. In Zooplankton (Risebrough,1972) und wasserlebenden Wirbellosen und Fischen (Koeman,1969, Nimmo,1971) stellte man eine beträchtliche Anreicherung von PCB's gegenüber dem Wasser fest. Sanders (1972) fand bei vergleichenden Untersuchungen an wasserlebenden Wirbellosen eine Anreicherung um das 5 000 - 47 000 -fache der PCB-Konzentration im Wasser. In Nahrungsketten kommt es zu einer Anreicherung der polychlorierten Biphenyle, da sie im Organismus nur langsam abgebaut und ausgeschieden werden. Dementsprechend sind fleischfressende Vögel und Säugetiere einer besonders hohen Belastung ausgesetzt (Jensen,1969, Hammond,1972, Bagley, 1970).

Die Untersuchung von Wildtieren in verschiedenen Ländern, wie Kanada (Reynolds,1969), Großbritannien (Prestt,1970), Schweden (Odsjö,1972, Olsson,1972) verdeutlichte die ubiquitäre Verbreitung der PCB's auch in industriefernen Gebieten. In vielen Fällen war die PCB-Konzentration höher als die des Insektizids DDT.

2.5. Rückstände im menschlichen Körper

Durch kontaminierte Nahrungsmittel (Ernährungsbericht 1972), Luft und Wasser gelangen polychlorierte Biphenyle auch in den menschlichen Organismus. Eine weitere Möglichkeit der Aufnahme besteht durch direkten Kontakt bei der Verarbeitung von PCB's oder beim Umgang mit PCB-haltigen Industrieprodukten (Masuda,1972).
In Humanmilch und Humanfett (Acker u. Schulte,1970,Biros,1970, Yobs,1972) wurden in Deutschland und in USA polychlorierte Biphenyle bis zu einer Konzentration von 5 ppm(+) (bez. auf Fett) gefunden.

3. Toxikologie

3.1. Akute Vergiftungen beim Menschen

Vergiftungsfälle durch PCB's wurden in früheren Jahren vor allem bei Arbeitern in der Elektroindustrie beobachtet (Drinker,1937, Peck, 1944, Meigs,1954). Dabei handelte es sich vornehmlich um Hauterkrankungen, die als Chlorakne bezeichnet wurden.
In Japan kam es 1968 zu einer Massenvergiftung durch PCB's ("Yusho-Erkrankung") die aus einem umdichten Wärmeaustauschersystem in Reisöl gelangt waren (Kuratsune,1972).
Dabei wurden u.a. Schwellungen der Augenlider, akneartige Hautausschläge, ödematöse Schwellungen der Gliedmaßen, Erschöpfung und Übelkeit, sowie Gelenk- und Rückenschmerzen beobachtet.

3.2. Allgemeine Toxizität

In zahlreichen Untersuchungen wurden verschiedene toxische Wirkungen von PCB's festgestellt. Ein Überblick findet sich bei Kimbrough (1972) und Richter (1974).

(+) ppm ≙ parts per million ≙ mg/kg

Im Vordergrund des klinischen Erscheinungsbilds steht die Hepatotoxizität. Pathologische Veränderungen der Leber wurden bei Ratten (Vos,1971, Bruckner, 1973,Kimbrough,1973), Kaninchen (Koller,1973), sowie Mäusen und Affen (Nishizumi,1970) im licht- und elektronenmikroskopischen Bereich beobachtet.
Bei Rhesusaffen fand man nach dreimonatiger Verabreichung von Futter, das 300 ppm PCB's enthielt, neben Ödemen und Haarausfall Veränderungen der Magenschleimhaut, die die Möglichkeit carcinogener Wirkungen andeuten (Allen et al.,1973). Daneben traten in vielen Fällen Wachstumsverzögerung und Gewichtsverluste auf.
Gegenüber Humanzellkulturen (HeLa-Zellen und Fibroblasten) zeigten PCB's cytostatische Wirkung und erwiesen sich als ebenso toxisch, wie DDT (Litterst,1971).
Neurotoxische Wirkungen wurden bei Ratten (Bruckner,1973) und bei Patienten mit akuter PCB-Vergiftung (Murai,1971) beobachtet. Dabei waren vor allem die peripheren sensorischen Nerven betroffen.

3.3. Wirkung auf Enzymsysteme der Leber

In einer großen Zahl von Untersuchungen wurde die induzierende Wirkung von PCB-Gemischen und Einzelsubstanzen auf verschiedene Enzymsysteme der Leber (Johnstone,1974, Chen u.DuBois,1973, Chen et al. 1973), insbesondere die mikrosomalen Leberenzyme von Ratten (Litterst,1972) und Kaninchen (Villeneuve et al.,1971) und qualitative und quantitative Veränderungen des Cytochrom P-450 festgestellt (Alvares,1973, Bickers,1974).
Durch Verabreichung von PCB's konnte bei Ratten Leberporphyrie erzeugt werden (Goldstein,1974).

4. Pharmakokinetik und Metabolismus

4.1. Resorption und Verteilung im Organismus

Polychlorierte Biphenyle werden aufgrund ihrer unpolaren Struktur sowohl im Darm als auch durch Haut und Lunge sehr gut resorbiert.
Bei oraler Verabreichung von verschiedenen PCB-Isomeren und Chlorhomologen an Ratten fand man bei einer Dosis von 5 µg/g eine Resorption von über 95 % der verabreichten Menge (Albro und Fishbein,1972). Bis zu einer Dosis von 100 µg/g wurden in allen Fällen über 90% aufgenommen.

Nach einmaliger Exposition von Ratten mit Aerosolen eines technischen PCB-Gemisches (Benthe,1972) fand man in Abhängigkeit von der Dauer der Exposition eine steile Zunahme der Konzentration in der Leber. Bereits nach 15 Minuten betrug die Konzentration mehr als 50% des Maximalwerts, der nach zwei Stunden erreicht wurde.
Nach wiederholter dermaler Applikation verschiedener PCB-Gemische fand man bei Kaninchen (Vos,1971) neben Hautschäden auch degenerative Veränderungen in der Leber und Niere, die eine gute dermale Resorption vermuten lassen.
Die Verteilung von PCB's im Organismus von Säugetieren wurde eingehend untersucht. PCB's konnten in allen Organen nachgewiesen werden, wobei die höchsten Konzentrationen im Fettgewebe gefunden wurden (Curley,1971, Grant,1971).
Die Maximalwerte im Fettgewebe werden allerdings erst später erreicht als in anderen Organen, was auf eine Umverteilung im Organismus schliessen lässt (Benthe,1972).
Die Konzentration in einzelnen Organen nimmt in der Reihenfolge: Fettgewebe Leber Gehirn Niere Muskulatur Blut ab und entspricht somit in etwa dem jeweiligen Lipidgehalt.
Mit steigendem Chlorierungsgrad nimmt die Speicherung zu (Villeneuve,1972).
Diaplazentarer Übertritt von PCB's wurde bei Kaninchen (Grant,1971) und Kühen (Platonow,1973) beobachtet.

1.2. Pharmakokinetik von polychlorierten Biphenylen

Nach intravenöser Verabreichung eines technischen PCB-Gemischs an Schweine und Schafe wurde das pharmakokinetische Verhalten von neun Einzelkomponenten (Borchard et al.,1974) unter Zugrundelegung eines Zwei-Kompartiment-Modells untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die einzelnen Bestandteile mit unterschiedlicher Geschwindigkeit aus dem Blut eliminiert werden.
Bei Beagle- Hunden fand Couvillion (1974) eine Eliminationskinetik erster Ordnung für Aroclor 1254.
Die Elimination von 2,4,5,2'5'-Pentachlorbiphenyl nach intravenöser Verabreichung an Ratten (Matthews,1974) zeigte für Blut und Leber einen biphasischen Verlauf, wobei die Blutkonzentration anfangs rasch absank.

5. Metabolismus von polychlorierten Biphenylen

Polychlorierte Biphenyle werden teilweise unverändert mit den Faeces, daneben überwiegend in Form von hydroxylierten Metaboliten mit den Faeces und dem Harn ausgeschieden. Dechlorierung wurde bisher nur bei Dichlorbiphenylen (Goto,1973) beobachtet.

Der Metabolismus von Mono-, Di-, Tetra- und Hexachlorbiphenylisomeren wurde an Ratten, Tauben und Forellen untersucht (Hutzinger,1972). Bei Ratten und Tauben fand man Monohydroxyderivate von %-Chlor-, 4,4'-Dichlor- und 1,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl, sowie bei der Ratte 4-Chlordihydroxybiphenyl. Von 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl wurden bei keiner Spezies Metaboliten gefunden. Bei der Forelle konnten in keinem Fall Metaboliten nachgewiesen werden.

Bei Kaninchen fand man im Harn nach Verabreichung von 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl (Gardner et al.,1973) insgesamt drei Metaboliten, davon zwei Monohydroxyderivate sowie trans-3,4,-dihydro-,3,4,-dihydroxy-2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl.

Der Metabolismus verschiedener Dichlorbiphenyl-Isomerer wurde bei Ratten untersucht (Goto,1973). Dabei fand man bis zu vier Metaboliten, darunter Monohydroxy- und Dihydroxyderivate sowie Monochlor-hydroxy-biphenyle.

Bei 2,4,3'4'-Tetrachlorbiphenyl wurden neben großen Mengen der Ausgangssubstanz bis zu vier Monohydroxyderivate in den Faeces von Ratten gefunden (Yoshimura,1973).

Die Ausscheidung von Biphenyl und 4-Chlorbiphenyl im Harn von Kaninchen erfolgt neben freien Phenolen auch in Form von konjugierten Verbindungen, z.B. als Glucuronid (Block,1959).

Infolge der unterschiedlichen Metabolisierbarkeit einzelner Komponenten von technischen PCB-Gemischen wurde im Organismus von Vögeln und Säugetieren häufig eine Veränderung der Zusammensetzung gegenüber der Ausgangssubstanz beobachtet.(Bailey u. Bunyan,1972, Yoshimura,1971). Insbesondere fand man eine Anreicherung der höherchlorierten Isomeren und eine rasche Elimination der niedrigchlorierten Bestandteile.

6. Chlorkohlenwasserstoffinsektizide

Die vorhandene Literatur über die Chemie und Toxikologie der Chlorkohlenwasserstoffinsektizide ist so umfangreich, daß eine Übersicht über den

über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen würde. Es sei daher auf die ausführlichen Zusammenfassungen von Robinson (1970), Jager (1970) und bei Wegler (1970) verwiesen.
Eine umfassende Übersicht über die bis 1973 erschienenen Untersuchungen über polychlorierte Biphenyle findet sich bei Richter (1974).

B Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsprogramms "Polychlorierte Biphenyle" des BMFT in der Abteilung für Toxikologie der GSF, München, durchgeführt. Sie sollte einen Beitrag zur Kenntnis des pharmakokinetischen Verhaltens von PCB's im Organismus von Säugetieren leisten.
Gegenüber der Vielzahl von Untersuchungen mit toxikologischer Fragestellung wurde die Pharmakokinetik von polychlorierten Biphenylen nur in geringem Umfang untersucht (Borchard et al.,1974, Couvillion,1974, Matthews,1974 .
Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Frage nach der Bindung dieser Stoffe an Plasmaproteine und der Bedeutung der Proteinbindung für den Transport im Blut.
Die Proteinbindung von polychlorierten Biphenylen wurde bisher nicht untersucht; für Chlorkohlenwasserstoffinsektizide liegen einige Arbeiten vor (Weikel,1958, Moss u. Hathway,1964, Mick,1971, Ferry et al. 1972, Morgan,1972, Jakubowski,1973, Schoor,1973). Diese Arbeiten sind wegen der Unterschiede in der Fragestellung und Durchführung untereinander nicht ohne weiteres vergleichbar. Es erschien daher gerechtfertigt, einige Chlorkohlenwasserstoffinsektizide in die vergleichende Untersuchung einzubeziehen. Zugleich sollte festgestellt werden, ob hinsichtlich der Proteinbindung Unterschiede zwischen PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden bestehen.
Daneben interessierte vor allem die Frage, ob ein Zusammenhang der Proteinbindung und Verteilung im Blut mit dem Chlorierungsgrad einzelner Isomerer besteht.
Weiterhin war zu untersuchen, ob PCB's in Blutzellen eindringen können und inwieweit die zellulären Bestandteile des Blutes am Transport be-

teiligt sind.
Der Einfluß der Proteinbindung auf den Übertritt aus dem Blut in die Organe sollte am Beispiel der isoliert perfundierten Leber untersucht werden.
Die Messung der Kinetik der Verteilung und Ausscheidung von 2,2'-Dichlorbiphenyl, das als Modellsubstanz für niedrigchlorierte PCB's verwendet wurde, an Ratten in vivo sollte die Untersuchungen an der isolierten Leber ergänzen. Diese Versuche standen in Zusammenhang mit klinisch chemischen Untersuchungen an Ratten nach oraler Verabreichung einer hohen Einzeldosis von 2,2'-Dichlorbiphenyl, die in der Abt. für Toxikol. der GSF durchgeführt werden.

2. Auswahl der untersuchten Verbindungen

Die vergleichenden Untersuchungen zur Proteinbindung und zum Transport wurden mit definierten chlorhomologen und stereoisomeren chlorierten Biphenylen durchgeführt. Diese bieten gegenüber den technischen PCB-Gemischen, die bisher meist für experimentelle Untersuchungen verwendet wurden, verschiedene Vorteile.
Wesentlich erschien vor allem die Möglichkeit, die Untersuchungen in Abhängigkeit von Chlorierungsgrad und substanzspezifischen Parametern, wie Wasserlöslichkeit und Octanol/Wasser- Verteilungskoeffizienten zu untersuchen. Ferner ist eine genauere quantitative Bestimmung möglich, da bei PCB-Gemischen Veränderungen in der Zusammensetzung der Probe gegenüber der Vergleichssubstanz, z.B. durch unterschiedliche Verteilung der Komponenten nur näherungsweise erfasst werden können.
Für die Untersuchungen wurden fünf verschiedene chlorhomologe bzw. isomere chlorierte Biphenyle mit einem Chlorierungsgrad von 1 - 6 Chloratomen je Molekül verwendet. Für die Auswahl der nachstehend aufgeführten Verbindungen war maßgeblich, daß sie in technischen Gemischen enthalten sind (Sissons u. Welti,1971) und außerdem innerhalb der Abt. für Toxikologie der GSF bei der Bearbeitung biochemischer und klinisch-chemischer Fragestellungen Verwendung finden.
Die Chlorkohlenwasserstoffinsektizide p,p'-DDT, Dieldrin und Lindan wurden wegen ihrer Bedeutung als Umweltchemikalien (Wegler,1970) ausgewählt.

Folgende Verbindungen wurden untersucht:
(Strukturformel s. Abb.2)

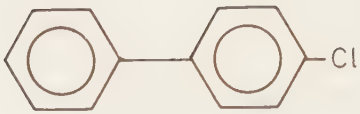
4 - Chlorbiphenyl (+)
2,2'-Dichlorbiphenyl (+)
2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl (+)
2,4,6,2'4'6' - Hexachlorbiphenyl (+)
2,3,4,5,2'3' - Hexachlorbiphenyl (+)

p,p'- DDT (Dichlorbiphenyltrichloräthan)
Lindan (γ - Hexachlorcyclohexan)
Dieldrin (1,2,3,4,10,10-hexachlor - 6,7 -epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4,5,8, -endo -exo - dimethanonaphthalin)

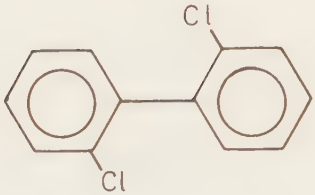
Als Beispiel für ein technisches PCB - Gemisch wurde Clophen A 30 (Chlorgehalt 41%, Bayer AG, Leverkusen) verwendet.

(+) Diese Substanzen wurden freundlicherweise vom Inst. für ökolog. Chemie der GSF zur Verfügung gestellt.

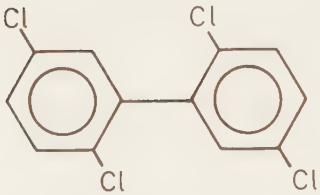
Abb. 2



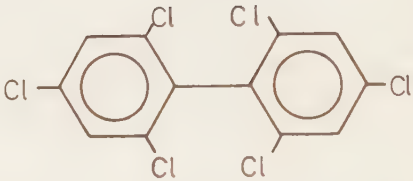
4 - Chlorbiphenyl



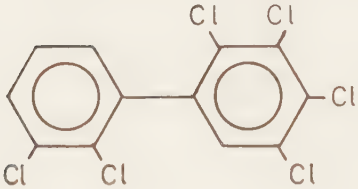
2,2' - Dichlorbiphenyl



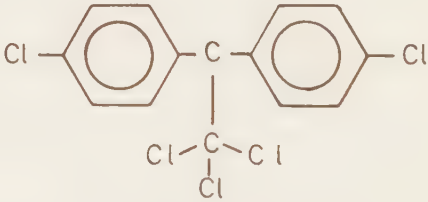
2,5,2'5' - Tetrachlorbiphenyl



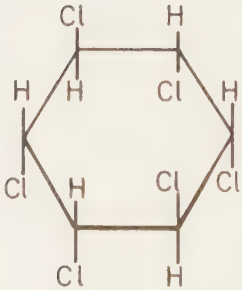
2,4,6,2'4'6' - Hexachlorbiphenyl



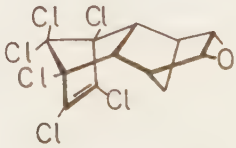
2,3,4,5,2'3' - Hexachlorbiphenyl



p,p' - Dichlordiphenyl-
trichloräthan (p,p'-DDT)



γ - Hexachlorcyclohexan
(Lindan)



Dieldrin

C Eigene Untersuchungen

I. Material und Methoden

1. Allg. Analytik

Die quantitative Bestimmung der polychlorierten Biphenyle und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide erfolgte gaschromatographisch (s.1.4.)

Die Bestimmung von Serumproteinen wurde mit Biuret - Reagens ausgeführt. Niedrige Proteinkonzentrationen ($<$ 2.5 mg/ml) wurden nach Lowry (1951) bestimmt. Bei Verwendung von reinem Serumalbumin wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen und die Konzentration anhand einer Eichkurve ermittelt.

1.1. Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien

a) Lösungsmittel

Äthanol p.A., Merck (Darmstadt)
Benzol p.A. , Merck
Essigsäureäthylester p.A., Merck
Hexan, rein, Merck
Hexan zur Rückstandsanalyse, Merck
Isopropylalkohol, p.A., Merck
Toluol p.A., Merck
n - Octanol, p.A., Merck

b) Proteinbindung

Albumin aus Rinderserum,krist.,reinst, Serva (Heidelberg)
α-Globulin aus Rinderserum, lyophil., Serva
β-Globulin aus Rinderserum, lyophil., Serva
γ-Globulin aus Rinderserum, lyophil. , Serva

Bio-Gel P-10, Bio-Rad
Controlled-Pore-Glass CPG 10, Serva
Sephadex G 50 medium, Roth
Visking - Dialysierschlauch 8/32, Serva

c) Verteilung im Blut

Dextran 60 C, MW 77 000, Sigma Chem. Corp.
Heparin- Na, 161 000 IE/g, Serva
tri-Natriumzitrat-2-hydrat z. Blutstabilisierung, Merck
Manganchlorid ($MnCl_2 \cdot H_2O$) p.A., Merck

d) Elektrophorese

Cellogel-Streifen, 25 x 170 x 0.3 mm, Serva
Cellogel-Blöcke, 60 x 170 x 2 - 3 mm, Serva
Amidoschwarz 10 B reinst, Serva
Ponceau - S für Elektrophorese, Merck

e) Puffersubstanzen

Na_2HPO_4 p.A. , Merck
KH_2PO_4 p.A., Merck
Diäthylbarbitursäure für Puffer, Serva
Diäthylbarbitursäure-Na für Puffer, Serva
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, rein, Serva

1.2. Prüfung der Reinheit und Nachreinigung von Lösungsmitteln

50 ml Hexan bzw. Essigsäureäthylester wurden auf ca. 0.5 ml eingeengt und 5 µl davon gaschromatographiert. Äthanol und Isopropylalkohol wurden bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 1 ml Hexan aufgenommen. Hexan zur Rückstandsanalyse, Äthanol und Isopropanol konnten ohne Vorreinigung verwendet werden, da sie keine bei der Gaschromatographie mit EC- Detektor störenden Verunreinigungen enthielten.
2.5 l Hexan (rein) wurden über eine Chromatographiesäule (50 x 2.5 cm) mit Aluminiumoxid (ca. 100 g, Merck, aktiv, neutral) gereinigt. Ein Vorlauf von 250 ml wurde verworfen bzw. nochmals gereinigt.
Essigsäureäthylester und Benzol wurden vor Gebrauch unter Rückfluß destilliert. Die verwendeten Lösungsmittel wurden regelmäßig auf Rückstände geprüft.
Vorhandene Verunreinigungen konnten quantitativ entfernt werden.

1.3. Reinigung von Laborgeräten

Kunststoffgeräte wurden mit Ausnahme von Lupolenstopfen für Zentrifugengläser nicht verwendet.
Glasgeräte wurden nach Gebrauch mit handelsüblichen Laborspülmitteln gereinigt, danach mit Aqua dest. und Isopropanol p.A. gespült und im Trockenschrank getrocknet.
Pipetten wurden vor dem Spülen einige Stunden in Chromschwefelsäure eingelegt.
Die in dieser Weise gereinigten Glasgeräte enthielten keine nachweisbaren störenden Rückstände.

1.4. Gaschromatographie

Es wurde ein Hewlett-Packard-Gaschromatograph 5750 mit gepulstem Ni^{63}- electron-capture-Detektor verwendet.

Bedingungen:

Säule: Glas, Länge 6 ft, i.D. 4 mm
Stationäre Phase: 3.8% SE 30 bzw. 3% OV 1 auf Chromosorb W/AW DMCS
80 - 100 mesh
Trägergas: Helium oder Stickstoff, 60 - 80 ml/min
Make - up-Gas: Argon-Methan (95% Ar) 50 - 60 ml/min
Injektorblock: 260°C
Ofentemperatur: 180 - 240°C
Detektor: 260 - 280°C
Attenuation: 10/16
Pulsintervall: 150 µs

1.4.1. Quantitative Bestimmung

Für die quantitative Bestimmung der PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide wurde eine Standardlösung bekannter Konzentration der betreffenden Substanz verwendet.
Aus einer Stammlösung (1 mg/ml Toluol) wurde durch Verdünnen der Gebrauchsstandard (1 ng/µl für 4-Chlorbiphenyl, 2,2'-Dichlorbiphenyl und 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl; 0.5 und 0.1 ng/µl für Hexachlorbiphenyle, DDT und Dieldrin, 0.05 ng/µl für Lindan und Hexachlorbenzol

in Hexan) hergestellt.
Die Lösungen wurden im Tiefkühlschrank (- 18°C) aufbewahrt. Gebrauchsstandards wurden in Abständen von 4 - 6 Wochen erneuert.
Die Bestimmung erfolgte durch Messung der Peakhöhe und Vergleich mit einer Eichkurve, die jeweils am Tag der Bestimmung aufgenommen wurde um Schwankungen in der Detektorempfindlichkeit auszugleichen.
Bei PCB-Gemischen wurden die Hauptpeaks ausgemessen und die Peakflächen zur Bestimmung verwendet.
Im letzten Halbjahr stand für die Auswertung ein elektronischer Digitalintegrator (Hewlett-Packard,3380 A) zur Verfügung. Dabei wurde die Methode der externen Standardisierung verwendet.
Bei wiederholter Bestimmung einer Probe traten im allgemeinen Schwankungen unter $\pm$ 3 % auf.
Die untere Grenze für quantitative Bestimmungen lag für die niederchlorierten PCB's bei ca. o.5 x 10^{-9} g, für höherchlorierte PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide zwischen 0.1 - 0.01 x 10^{-9} g.

1.5. Extraktion von PCB's aus wässrigen Lösungen

Die Extraktion von PCB's und Insektiziden aus Blut und Plasma sowie Phosphatpuffer- bzw. Proteinlösungen erfolgte durch Ausschütteln der Probe mit Hexan (Radomski,1971).
0.5 - 2 ml der betreffenden Probe werden in einem verschlossenen 10 ml -Zentrifugenglas mit dem doppelten Volumen Hexan 2 - 3 Minuten kräftig geschüttelt. Dabei bildet sich eine zähflüssige Hexan-Wasser-Emulsion.
Die Phasentrennung wird durch wiederholtes Zentrifugieren bei 2000 g in hartnäckigen Fällen durch Einfrieren und Zentrifugieren nach dem Auftauen erreicht. Der so erhaltene Hexanextrakt wird ohne weitere Reinigung gaschromatographiert.
Kontrollversuche ergaben eine Ausbeute von 95% bei einmaliger und 95 - 98 % bei wiederholter Extraktion. Versuche mit ^{14}C-Dichlorbiphenyl ergaben eine Ausbeute von 95.2% bei einmaliger Extraktion von Rinderplasma bei einer Wiederfindungsrate von 99.4% der eingesetzten Aktivität.
Der Proteingehalt der Proben hatte keinen nachweisbaren Einfluß auf die Extrahierbarkeit.
Blut und Blutzellen wurden vor der Extraktion durch Zugabe des gleichen Volumens Aqua dest. hämolysiert.

2. Messung der Proteinbindung

2.1. Gleichgewichtsdialyse

Für die Durchführung der Gleichgewichtsdialyse wurde Visking-Dialyseschlauch 8/32 (Serva) mit einem Durchmesser von 7 mm (Wandstärke 0.05 mm, durchschnittl.Porendurchmesser 15 - 20 Å) verwendet.
30 cm lange Schlauchstücke wurden 1 h in mehrmals gewechseltem Aqua dest. gewässert und oberflächlich abgetrocknet, danach an einem Ende abgebunden und mit 5 ml Rinderplasma bzw. Albuminlösung gefüllt.
Als Pufferlösung wurde Phosphatpuffer n. Sörensen (1/15 M, pH 7.4) verwendet.
Das obere Ende des Schlauchs wurde mit zwei Knoten verschlossen und das so entstandene Säckchen an einem Draht aus nicht rostendem Stahl befestigt. Die Säckchen wurden in Glasröhren von 35 cm Länge mit einem Innendurchmesser von 8 mm, die je 10 ml Phosphatpuffer enthielten, eingehängt. Das Glasrohr wurde mit einem durchbohrten Plexiglasdeckel verschlossen (Abb.3).
Während der Dialyse wurde der Dialyseschlauch am Draht langsam auf und ab bewegt. Dadurch wurde die Aussenflüssigkeit laufend gemischt und strömte an dem Schlauch vorbei.
Die untersuchten Substanzen wurden in Äthanol gelöst (20 mg/ml) und der Pufferlösung in den Glasröhren in einer Konzentration von 20 µg/ml zugesetzt. Ursprünglich war vorgesehen, eine Konzentration von 10^{-4} M zu verwenden. Da die Löslichkeit der PCB's unter 10^{-7} M liegt, wurden einheitlich 20 mg/l zugegeben wobei anfangs eine milchige Trübung auftritt, die auf die Bildung einer Emulsion zurückzuführen ist. Während der Versuchsdauer von 48 - 72 h kam es zur Entmischung unter Bildung eines flockigen Bodensatzes, Die Konzentration im Überstand entsprach während des Versuchs der Löslichkeit in Wasser.
Die Dialyse wurde bei + 3° und + 22°C durchgeführt. Die Versuchsdauer, entsprechend der Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts, wurde in Vorversuchen ermittelt.
Nach Ende des Versuchs wurden die Schläuche entnommen, in Aqua dest abgespült und oberflächlich abgetrocknet. Der Inhalt wurde mit einer Pipette entnommen. 2 ml der Proteinlösung wurden mit 2 ml Hexan extrahiert und die PCB-Konzentration gaschromatographisch bestimmt.

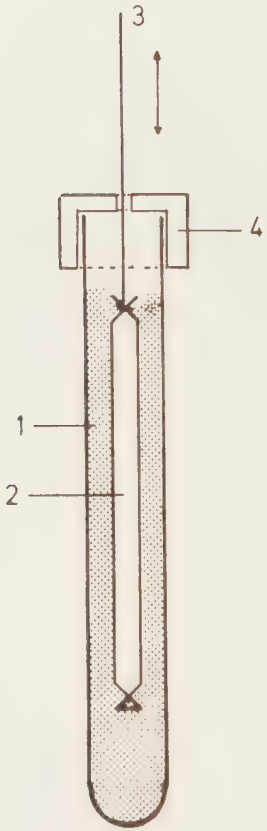


Abb. 3

Apparatur für die Gleichgewichtsdialyse (Schema)

1 Pufferlösung mit PCB's

2 Dialyseschlauch, mit Proteinlösung

3 Stahldraht

4 Plexiglasdeckel

2.2. Bestimmung der Löslichkeit

0.2 mg der untersuchten Verbindung wurden in äthanolischer Lösung auf Filtrierpapierscheiben von 3 cm Durchmesser aufgetropft und diese an der Luft getrocknet. Danach wurden die Papierstücke in 25 ml-Erlenmayerkolben mit 10 ml Puffer- bzw. Proteinlösung verbracht und diese 24 h bei 3°C bzw. 22°C geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung durch Membranfilter (Millipore,1.2 µ Porendurchmesser) filtriert und 2 ml des Filtrats extrahiert.
Zur Kontrolle wurden 5 mg der PCB's in Substanz mit 10 ml der Proteinlösung geschüttelt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten keinen Unterschied zu den oben beschriebenen.

2.3. Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurden Glassäulen (35 x 2 cm; 100 x 0.4 bzw. 0.8 cm) verwendet. Ein Kühlmantel, der die Säulen in ganzer Länge umgab, erlaubte in Verbindung mit einem Thermostaten mit Umwälzpumpe (Haake) ein Arbeiten bei konstanten Temperaturen.
Für die Elution wurde eine Serva-Schlauchpumpe benutzt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug zwischen 0.5 und 2 ml/min.
Der Eiweißgehalt des Eluats wurde mit einem UV- Photometer mit Durchflußküvette (Uvicord,LKB) kontinuierlich verfolgt. Das Eluat wurde in Fraktionen von 2 - 3 ml gesammelt und der Proteingehalt durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt .
Vor Auftrag der Albuminlösung wurde die Säule jeweils mit 400 - 500 ml Phosphatpuffer n. Sörensen, 1/15 M, pH 7.4, mit einem Gehalt von 1 µg /ml 2,2'-Dichlorbiphenyl equilibriert. Die aufgetragene Albuminlösung enthielt Dichlorbiphenyl in gleicher Konzentration.
Die Lösungen wurden jeweils unmittelbar vor Gebrauch angesetzt, da die PCB-Konzentration innerhalb von 24 Stunden infolge von Adsorption an die Gefäßwand um 50 - 60% abnimmt.
Zur Herstellung der PCB-Lösung wurden 500 ml Phosphatpuffer im Vakuum entgast und unter Rühren mit 50 (100) µl äthanol. 2,2'-Dichlorbiphenyllösung versetzt. Nach 10 Minuten wurde diese Lösung durch ein Membranfilter (Millipore , 0.22 µ Porendurchmesser) filtriert. Die PCB-Konzentration wurde bestimmt.

Albuminlösungen wurden in verschiedenen Konzentrationen (0.1 - 10 mg/ml) und Volumina (0.2 - 20 ml) aufgetragen.
Die Säulentemperatur wurde konstant bei 22° bzw. 37° gehalten.
Als Säulenfüllung wurde Sephadex G 50 medium, sowie Bio-Gel P 10 und Controlled-Pore-Glass CPG 10 verwendet.
Die Pufferlösung, die zum Vorquellen des Gels verwendet wurde, enthielt ebenfalls 2,2'-Dichlorbiphenyl. In einer weiteren Versuchsreihe wurde das trockene Sephadex-Gel mit einer äthanolischen Lösung von Dichlorbiphenyl getränkt und das Äthanol abrotiert. Die Konzentration im Gel betrug in diesem Fall 2 mg/g , bez. auf Trockengewicht.

3.1. Verteilung von polychlorierten Biphenylen im Blut

Für die Untersuchung der Verteilung von PCB's im Blut wurde frisches Rinderblut verwendet. Zur Gerinnungshemmung wurden 2 ml einer 33% Lösung von Natriumzitrat in Aqua dest. je 100 ml Blut zugesetzt.
3 x 20 ml Blut wurden in 50 ml-Erlenmayerkolben mit 20 µl einer äthanol. PCB-Lösung (5 mg/ml) versetzt, so daß eine Endkonzentration von 5 mg/ml erreicht wurde. Die Kolben wurden mit Parafilm verschlossen und im Wasserbad unter Schütteln bei 37°C 30 (60) Minuten inkubiert.
Vor Zugabe der PCB-Lösung wurde das Blut 5 min bei 37°C temperiert.
Anschließend wurden die Kolben im Eisbad abgekühlt und 1 ml Blut entnommen, mit dem gleichen Volumen Aqua dest. versetzt und mit 2 ml Hexan extrahiert. Je 3 ml Blut wurden zur Gewinnung von Plasma 10 min bei 400 g zentrifugiert und 1 ml Plasma mit 2 ml Hexan extrahiert.
Für die Untersuchung der Blutzellen (Erythrozyten + Leukozyten) wurden 2 ml Blut wie oben zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und die Blutzellen in 3 ml einer 2.2%-igen Lösung von Natriumzitrat resuspendiert, dann nochmals zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Danach wurde 1 ml Aqua dest. zugesetzt, um die Zellen zu hämolysieren und 1 ml des Hämolysats mit Hexan extrahiert.
Das restliche Hämolysat wurde 15 min bei 400 g zentrifugiert, um die Zellmembranen zu sedimentieren. 1 ml des membranfreien Überstands wurde extrahiert.
In Vorversuchen wurde von den gewaschenen Blutzellen die Leukozytenschicht abpipettiert, nochmals gewaschen und gesondert aufgearbeitet. Ebenso wurde das Membranpellet nach Hämolyse mit 6.7 mM NH_4OH (Goldblatt et al.,1960) und Zentrifugation mehrmals in 6.7 mM NH_4OH resuspendiert

und anschließend extrahiert.
Zur Gewinnung von Leukozyten wurden 3 ml Blut mit 1 ml einer 6% Lösung von Dextran in 0.9% NaCl-Lösung vermischt (Dennes, Tupper & Wormall, 1961) und bei Raumtemperatur stehengelassen, bis die Erythrozyten sedimentiert waren. Der Überstand, der die Leukozyten enthält, wurde 3 min bei 50 g zentrifugiert und das Leukozytenpellet mehrmals mit 0.9 % NaCl gewaschen und danach extrahiert.
Die Präparationen wurden durch mikroskopische Kontrolle von Ausstrichpräparaten überprüft.
Zur Abtrennung der β-Lipoproteinfraktion wurden 3 ml Plasma mit 0. 15 ml 1 M $MnCl_2 \cdot H_2O$ gemischt und nach 15 min bei 4 00 g 10 min zentrifugiert, um die ausgefällte Lipoproteinfraktion abzutrennen (Burnstein u.Samaille, 1960). 1 ml des Überstands wurde extrahiert.
Wie Vorversuche ergaben, ist die Konzentration von PCB's in den Erythrozytenmembranen sowie den Leukozyten und in der β - Lipoproteinfraktion für eine quantitative gaschromatographische Bestimmung zu gering. Daher wurden diese Präparationen nur in Einzelfällen durchgeführt.
Die Hexanextrakte wurden in jedem Fall ohne weitere Reinigung gaschromatographiert.
Bei den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Verteilung von der Proteinkonzentration im Plasma wurden 3 x 20 ml Blut vor der Inkubation mit den polychlorierten Biphenylen zentrifugiert und das Plasma nach mehrmaligem Waschen mit 2.2% Natriumzitrat durch 1/15 M Phosphatpuffer ersetzt.
Die Erhaltung der Blutzellen wurde mikroskopisch kontrolliert.

3.2. Elektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung von Serumproteinen wurde eine thermostatisierte Dünnschichtelektrophoresekammer (Desaga DE-Kammer) in Verbindung mit einem stabilisierten Netzgerät (Desaga 1200/200; 50 - 1200 V, 0 - 200 mA) verwendet.
Als Trägermaterial wurden Celluloseacetatfolien bzw. -blöcke (Cellogel, Chemetron, Mailand) benutzt.

Folgende Pufferlösungen wurden verwendet:

a) Veronal-Na-Veronal-Tris, pH 8.9

10.3 g Veronal-Na (Natriumdiäthylbarbiturat)
1.84 g Veronal (5,5,-Diäthylbarbitursäure)
7.2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
in 1 Liter Aqua bidest.

b) Veronal-Natriumacetat-HCl (Michaelis,1931), pH 8.6

29.4 g Veronal-Na
19.4 g Natriumacetat · 3 H_2O
180 ml n/10 HCl
in 3 l Aqua bidest.

Die Elektrophorese wurde 90 - 120 min bei 10 - 12 V/cm (5- 6 mA) bzw. 4.5 h bei 10 V/cm, 30 mA (präparative Trennung) bei 10° oder 20°C durchgeführt.
Der Auftrag der Serumproben erfolgte mit einer Mikropipette. Auf die Folien wurden 5 - 10 µl Serum aufgetragen. Bei Verwendung der Blöcke wurden 0.3 - 0.4 ml aufgetragen.
Für die Färbung der Proteinbanden wurde Amidoschwarz B (0.5% in Methanol/ Eisessig) oder Ponceau S (0.5% in 5% Trichloressigsäure), Dauer 5 min, verwendet. Die Entfärbung erfolgte in 5 % Essigsäure.
Bei präparativen Trennungen wurde von den Blöcken ein Abklatsch mit Hilfe einer CA-Folie angefertigt und dieser gefärbt.
Der Nachweis der PCB's erfolgte durch Zerschneiden der Blöcke und Extraktion durch Homogenisieren in Aqua dest. + Hexan oder Auswaschen der Proteine mit Puffer. Die so erhaltene Proteinlösung wurde mit Hexan extrahiert.
Bei Verwendung von ^{14}C-markierten Substanzen und Trennung auf Celluloseacetatfolien wurde der Nachweis vor dem Anfärben entweder durch Dünnschicht-Scanning (Dünnschicht-Scanner II, Berthold u. Frieseke) oder Kontaktautoradiographie (Agfa-Scientia-Film, 23 D 56 AH, Dauer der Exposition 14 Tage bei 3°C) geführt.

4. Bestimmung des Octanol/Wasser - Verteilungskoeffizienten

10 ml Octanol mit einem Gehalt von 500 µg/ml an PCB's wurden bei 22°C in einem 100 ml-Erlenmayerkolben mit Schliffstopfen mit 40 ml Aqua bidest. versetzt und entweder 3 min von Hand oder 15 min mechanisch geschüttelt. Das Gemisch wurde anschließend 45 min bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand (= Octanol) sorgfältig abpipettiert.
20 ml der wässrigen Phase wurden mit 30 ml Hexan extrahiert und das Hexan quantitativ in einen 50 ml-Spitzkolben überführt.
Das Hexan wurde auf ca. 1 ml eingeengt, das genaue Volumen bestimmt und anschließend gaschromatographiert.

5. Perfusion der isolierten Leber von Ratten

5.1. Aufbau der Apparatur

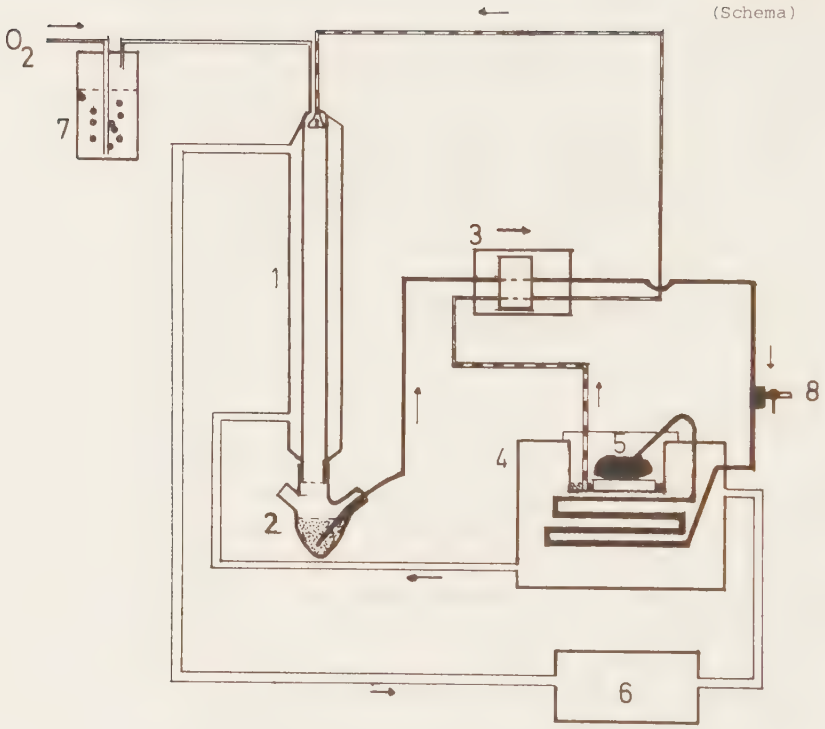
Abb. 4 zeigt schematisch den Aufbau der verwendeten Apparatur(+).
Die Leber (5) befindet sich in einer thermostatisierten feuchten Kammer. Mit Sauerstoff angereicherte Perfusionsflüssigkeit (s.u.) wird aus dem Vorratsgefäß (2) durch eine "Serva"-Mehrfachschlauchpumpe (3) mit regelbarer Geschwindigkeit angesaugt und durchläuft eine Schlauchspirale im Heizwassermantel der Perfusionskammer (4), wo sie auf 37°C erwärmt wird.
Über eine Teflonkanüle, die in die V.portae eingebunden ist, gelangt die Perfusionslösung in die Leber. Die aus der V. hepaticae und V.cava inferior austretende Lösung sammelt sich in einer Vertiefung am Boden der Kammer. Von dort wird sie kontinuierlich abgesaugt.
Die Anreicherung mit Sauerstoff erfolgt in einem thermostatisierten Rohr (1). Die Perfusionslösung gelangt über eine trichterförmige Erweiterung in das Rohr und fließt als dünner Film an der Innenwand in das Sammelgefäß (2) zurück. Durch eine Kanüle wird Sauerstoff, der in einer vorgeschalteten Waschflasche (7) bei 40°C mit Wasserdampf gesättigt wurde, eingeblasen. Als Sammelgefäß dient ein 25 ml-Dreihalskolben, dessen freie Öffnung die Probennahme während des Laufs gestattet. Die Entnahme bzw. Zufuhr von Perfusionslösung ist außerdem durch einen Dreiweghahn (8) vor der Leber möglich.

(+) Planung und Bau der Apparatur sowie die Durchführung der Präparation erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr.P. Spitzauer, Inst.f.ökolog.Chemie der GSF

Abb. 4

Leberperfusion

(Schema)



1 thermostat. Oxygenator

2 Auffanggefäß für O_2-reiches Blut

3 "Serva" - Mehrfach- Schlauchpumpe

4 thermostat. Perfusionskammer

5 Leber (Stelle der Probenentnahme)

6 Thermostat (Haake)

7 Waschflasche

8 Dreiweghahn

5.2. Präparation der Leber

200 g schweren Sprague-Dawley-Ratten werden in Narkose 5 - 8 ml Blut durch Herzpunktion entnommen. Anschließend wird die Bauchhöhle eröffnet.
Die V.cava inferior wird caudalwärts der Leber abgebunden und durchtrennt. Der Ductus choledochus wird abgebunden und durchtrennt.
Die V,cava inferior und die A.hepaticae werden im Thorax durchtrennt.
In die V.portae wird ein zugespitzter Teflonschlauch, der am vorderen Ende leicht verdickt ist, eingebunden. Danach wird die Leber mit 20 ml gekühlter 2.2% Natriumzitratlösung durchspült, um die Bildung von Blutgerinnseln zu verhindern. Während der weiteren Präparation wird die Leber laufend mit gekühlter Pufferlösung perfundiert und durch Auflegen von Eisstückchen abgekühlt, um den O_2-Verbrauch zu senken.
Die bindegewebigen Verwachsungen mit dem Zwerchfell werden durchtrennt und die Leber in die Perfusionskammer überführt.
Während der Präparation liegt das Versuchstier in einem Eisbad.
Die Perfusionslösung besteht entweder aus Rattenblut/Pufferlösung 1 : 3 oder Rinderplasma /Pufferlösung 1 : 1 (3ml/g Frischgewicht Leber).
Die Zusammensetzung der Pufferlösung geht aus Tab. 1 hervor.

6. Kinetik der Verteilung und Ausscheidung von 2,2'-DCB bei Ratten

Die Blut und Organproben für diese Untersuchung (16 - 144 h) wurden teilweise von der Arbeitsgruppe für klin.Chemie derAbt. für Toxikol. zur Verfügung gestellt.
300g schwere männliche Wistar-Ratten hatten durch Schlundsondierung eine einmalige Dosis von 1000 mg/kg Körpergewicht 2,2'-Dichlorbiphenyl in Olivenöl erhalten. Nach 1 - 144 h war den Tieren durch Punktion der linken Herzkammer Blut entnommen worden, wobei den Blutproben zur Gerinnungshemmung 50 IE Heparin/ml zugesetzt worden waren.
Die Blutproben (16 - 144 h) wurden für klinisch -chemische Untersuchungen verwendet; 0.2 - 0.5 ml standen für die Bestimmung der Dichlorbiphenylkonzentration zur Verfügung.
Im Anschluß an die Blutentnahme wurden die Tiere getötet und die nachstehenden Organe und Gewebe entnommen: Leber, Niere, Gehirn, Fettgewebe (Bauchfett), sowie (16 -96 h) Milz, Lunge, Herzmuskel und Skelettmuskel.

Tab. 1

Phosphatpuffer für die Leberperfusion (Krebs, in: Rauen, 1968)

100 ml	0.9% NaCl	(o.154 M)
4 ml	1.15% KCl	(0.154 M)
1 ml	2.11% KH_2PO_4	(0.154 M)
1 ml	3.82% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	(0.154 M)

10 - 20 ml Phosphatpuffer, 0.1 M p_H 7.4

Substrate:

4 ml	Na-Pyruvat , 0.16 M
7 ml	Na-fumarat , 0.1 M
4 ml	Na-Glutaminat 0.16 M
5 ml	Glukose, 0.3 M

Die Lösungen werden getrennt bei 3° C aufbewahrt. Der Puffer wird unmittelbar vor Gebrauch gemischt.

Bis zur Aufarbeitung wurden die Proben in Aluminiumfolie verpackt und bei - 18°C aufbewahrt.
Für die Untersuchung des relativ umfangreichen Probenmaterials erschien es zweckmäßig, ein wenig aufwendiges Verfahren auszuarbeiten.

6.1. Extraktion von 2,2'-DCB aus tierischen Geweben

Das nachstehend beschriebene Verfahren bewährte sich in Vorversuchen sehr gut. Es wurde daher für die Aufarbeitung sämtlicher Proben verwendet.
Die Organe werden aufgetaut und 500 mg (Fettgewebe 200 mg) in einer Porzellanreibschale mit 10 - 12 g wasserfreiem Natriumsulfat (Merck) zu einem homogenen Pulver verrieben.
Das Homogenat wird in Chromatographiesäulen (Länge 65 cm, i.D. 14 mm) die mit einem in Hexan gewaschenen Wattepfropfen versehen sind, eingefüllt. 50 ml Essigsäureäthylester werden auf die Säule aufgebracht und das Eluat in 100 ml-Spitzkolben aufgefangen. Der Extrakt wird am Rotationsverdampfer auf 1 - 2 ml eingeengt. Das genaue Volumen wird durch Wiegen des leeren und gefüllten Kolbens (1l Essigsäureäthylester ≙ 0.9 kg) ermittelt.

6.2. Clean-up

Die Abtrennung mitextrahierter Lipide, die bei der Gaschromatographie stören würden, erfolgt in herkömmlicher Weise durch Chromatographie über eine Aluminiumoxidsäule.
5 g Aluminiumoxid (aktiv,neutral,Merck), das zuvor durch Zugabe von 5.5 Gew.% Wasser desaktiviert wird, werden in eine Säule (30 x 0.7 cm) eingefüllt und 1 cm hoch mit wasserfreiem Natriumsulfat überschichtet. 1 ml Rohextrakt wird auf die trockene Säule aufgebracht und mit 15 ml Hexan eluiert. Das Eluat wird wiederum auf 1 ml eingeengt und das genaue Volumen bestimmt. Der Gehalt an 2,2'-DCB wird gaschromatographisch ermittelt.
Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß bei geringem apparativen und zeitlichem Aufwand zahlreiche Proben gleichzeitig aufgearbeitet werden können.
Vorversuche ergaben, daß ein Lösungsmittelvolumen von 50 ml für die Extraktion ausreicht. Die Nachextraktion mit je 25 ml Essigsäureäthyl-

ester und Hexan, die in getrennten Fraktionen aufgefangen wurden, ergab keine nachweisbaren Mengen Dichlorbiphenyl. Die Nachextraktion mit Benzol in einem Soxhlet-Apparat brachte das gleiche Ergebnis.
Kontrollversuche mit Zusatz von 2,2'-Dichlorbiphenyl zum Homogenat ergaben eine Ausbeute von ca. 95%. Gegenüber der Extraktion im Soxhlet-Apparat wurde praktisch kein Unterschied festgestellt.
Hexan erwies sich für die Extraktion als weniger geeignet.
Bei Versuchen, in denen die Organe bzw. das Gewebe-Natriumsulfat-Homogenat vor der Extraktion gefriergetrocknet wurden, sank die Ausbeute um 40 - 60% gegenüber den Kontrollen.
Das Einengen PCB-haltiger Lösungen bis zur Trockne ist bei quantitativen Bestimmungen zu vermeiden, da dabei Verluste bis zu 40 % durch Kodestillation auftreten.
Die Erfassungsgrenze für 2,2'-Dichlorbiphenyl liegt für das beschriebene Verfahren bei ca. 0.02 µg/g, bezogen auf Frischgewicht.

II. Ergebnisse

1. Bindung von PCB's an Rinderserumalbumin

Für die Messung der Proteinbindung wurden neben der Gleichgewichtsdialyse Löslichkeitsbestimmungen in Proteinlösungen und zwei Gelfiltrationstechniken verwendet. Die Löslichkeit in Wasser bzw. Phosphatpuffer wurde analog zu der in Proteinlösungen bestimmt (Tab.3). Die Konzentration des nicht an Protein gebundenen Anteils, die durch die Löslichkeit in Wasser begrenzt wird, ist sehr niedrig.
Daher trat bei der Gleichgewichtsdialyse die Adsorption an den Dialyseschlauch und die Gefäßwand stark in Erscheinung. Beispielsweise nimmt die Konzentration einer gesättigten Lösung von 2,2'-Dichlorbiphenyl in Phosphatpuffer infolge von Adsorptionserscheinungen innerhalb 24 Stunden um 50 - 60% ab.
Die untersuchten Substanzen wurden daher dem eiweißfreien Dialysat in einer Konzentration zugesetzt, die die Löslichkeit in Wasser um ein Vielfaches übersteigt. Dabei bildet sich eine Emulsion, die allerdings nur einige Stunden stabil bleibt. Durch den Überschuß bleibt jedoch während der gesamten Versuchsdauer (72 h bei 3°C, 48 h bei 22°C) eine gesättigte Lösung erhalten, während die Konzentration in der eiweißhaltigen Lösung bis zur Gleichgewichtseinstellung zwischen freiem und gebundenem Anteil ansteigt. Die Versuchsdauer wurde in Vorversuchen ermittelt.
Da die PCB-Konzentration in der Proteinlösung bestimmt wurde, konnte die Wandadsorption unberücksichtigt bleiben. Allerdings war es nicht möglich, den freien und gebundenen Anteil getrennt zu bestimmen.
Für die Berechnung wurde der freie Anteil hilfsweise mit der Löslichkeit in Wasser gleichgesetzt (Sahyun,1964).
Zur Absicherung der Ergebnisse wurde zusätzlich die Löslichkeit von PCB's in Albuminlösungen bestimmt. Die Ergebnisse stimmten im allgemeinen gut überein (Tab.2a,b).
In allen Fällen lag die Konzentration in eiweißhaltigen Lösungen beträchtlich über der Löslichkeit in Wasser.
Für die Berechnung wurde von den gemessenen Werten, entsprechend freiem und gebundenem Anteil, der freie Anteil (≙Löslichkeit in Wasser) subtrahiert. Die Zahl der gebundenen Moleküle je Albuminmolekül

Tab. 2 a

Bindung verschiedener PCB-Isomeren und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide an Rinderserumalbumin in Phosphatpuffer, p_H 7.4, 1/15 M, bei 3°C

Substanz	Methode	n (+)	Konz. Albumin (mg/ml)	µg Substanz/ mg Albumin	Anzahl der gebundenen Moleküle/Molekül Albumin	% gebunden
2,2'-DCB	D	35	10	1.43 ± 0.16	0.44 ± 0.049	98%
	D	26	5	1.35 ± 0.15	0.42 ± 0.046	95.9%
	D	5	2	3.25 ± 0.08	1.01 ± 0.0 25	95.7
	D	17	1	3.49 ± 0.35	1.08 ± 0.1	91.7
	L	8	1	3.37 ± 0.81	1.04 ± 0.25	91.4
4-Cl-B	D	1o	5	1.84 ± o.27	0.67 ± 0.1	96.4
	L	5	5	2.32 ± 0.86	0.85 ± 0.3	96.6
	L	5	1	1.69 ± 0.2	0.62 ± 0.07	75.7
2,5,2'5'-TCB	D	9	5	0.70 ± 0.07	0.16 ± 0.01	96.8
	D	10	1	1.39 ± 0.32	0.33 ± 0.07	90.7
	D	5	2	1.08 ± 0.19	0.25 ± 0.04	89.2
	L	10	1	1.13 ± 0.30	0.27 ± 0.07	90.4
2,4,6,2'4'6' HCB	L	5	5	0.34 ± 0.02	0.06 ± 0.003	98.3
	L	5	1	0.71 ± 0.07	0.13 ± 0.01	96.5
Dieldrin	D	10	2	0.39 ± 0.03	0.07 ± o.005	94.2
	L	10	2	0.39 ± 0.16	0.07 ± 0.005	94.2
	L	10	1	0.48 ± 0.04	0.08 ± 0.0005	90.7
DDT	D	5	10	0.17 ± 0.02	0.033 ± 0.004	99.3
	L	5	1	0.37 ± 0,08	0.072 ± 0.015	99.99

D = Dialyse

L = Löslichkeit

(+) n = Anzahl der Versuche

Tab. 2 b

Bindung an Rinderserumalbumin bei 22°C.

Substanz	Methode	n	C Albumin (mg/ml)	µg/mg Albumin	Anzahl der gebundenen Moleküle/Molekül Albumin	% gebunden
2,2'-DCB	D	5	5	2.83 ± 0.1	0.88 ± 0.03	96.1
	D	10	1	6.59 ± 0.36	2.05 ± 0.11	91.2
	L	10	1	6.26 ± 0.78	1.94 ± 0.24	90.7
4-Cl-B	L	5	5	4.16 ± 0.22	1.52 ± 0.08	90.1
	D	16	1	5.73 ± 0.53	2.1 ± 0.19	92.8
	L	22	1	5.23 ± 1.0	1.91 ± 0.36	92.2
2,5,2'5'-TCB	D	10	1	5.48 ± 0.24	1.3 ± 0.05	93.8
	L	10	1	6.49 ± 0.66	1.54 ± 0.15	94.7
Dieldrin	L	5	5	0.64 ± 0.06	0.11 ± 0.01	96.9
	L	5	2	0.88 ± 0.12	0.16 ± 0.02	94.3
	D	5	1	0.88 ± 0.04	0.16 ± 0.007	88.7
DDT	L	10	2	1.58 ± 0.53	0.31 ± 0.10	99.9

D = Dialyse

L = Löslichkeit

n = Anzahl der Versuche

Tab. 3

Löslichkeit in Phosphatpuffer, p_H 7.4

(µg/ml)

	3°C	22°C
4-Chlorbiphenyl	< 0.2	0.41 ± 0.06
2,2'-Dichlorbiphenyl	0.29 ± 0.13	0.58 ± 0.18
2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl	0.13 ± 0.07	0.34 ± 0.19
2,3,4,5,2'3'-Hexachlorbiphenyl	0.05 ± 0.02	< 0.1
2,4,6,2'4'6'-Hexachlorbiphenyl	0.03 ± 0.01	< 0.1
DDT	—	0.0012
Dieldrin	0.045 ± 0.016	0.1
Lindan	0.92 ± 0.05	1.17 ± 0.07

(MG Albumin ca. 69 000) und der gebundene Anteil wurden berechnet. Es wurde festgestellt, daß polychlorierte Biphenyle sowie DDT und Dieldrin in wässriger Lösung zu über 90 % an Albumin gebunden vorliegen. Der gebundene Anteil unterscheidet sich nur wenig, wobei kein Zusammenhang zwischen Chlorierungsgrad bzw. Molekülstruktur und Ausmaß der Proteinbindung feststellbar ist. Der gebundene Anteil des Lindans ist mit 64 - 78% gegenüber den Verbindungen mit aromatischer Molekülstruktur erheblich niedriger.
Größere Unterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen bestehen in der Zahl der gebundenen Moleküle pro Albuminmolekül.
Bei 22° ist die Zahl der gebundenen Moleküle gegenüber 3°C signifikant ($P < 0.01$) erhöht. Der gebundene Anteil ist dagegen nur wenig verändert. (s.Tab.2a,b).
In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Proteinbindung bei gleichzeitiger Anwesenheit von zwei Substanzen in der Lösung untersucht (Tab.4). Dabei wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:
Zwischen Dieldrin und 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl treten keine Wechselwirkungen auf. Die Bindung von 2,2'-Dichlorbiphenyl wird durch Dieldrin signifikant verringert ($P < 0.01$), ebenso die Bindung von 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl durch 2,2'-Dichlorbiphenyl. Bei 2,2'-Dichlorbiphenyl und Lindan ist die Zahl der gebundenen Moleküle beider Substanzen verringert.

2. Gelfiltration

Es wurde versucht, die Bindung von polychlorierten Biphenylen an Albumin mit Hilfe von Gelfiltration zu bestimmen. Zwei Verfahren (Hummel & Dreyer,1962, Nichol & Winzor,1964) kamen zur Anwendung.
Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Trennung von Arzneimittel- bzw. PCB- Molekülen von den Eiweißmolekülen aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße.
Ein einfaches Verfahren (Nichol & Winzor, 1964, Hofmann & Krieglstein, 1970) besteht darin, daß ein gegenüber dem Säulenvolumen großes Volumen (90% des Leervolumens der Säule) einer Eiweißlösung, die die betreffende Substanz enthält, aufgetragen wird. Die nicht an Protein gebundenen Moleküle der Substanz dringen in die Poren des Gels ein und werden aus der schneller wandernden Zone der Eiweißmoleküle, die nicht

Tab.4

Konkurrenz bei gleichzeitiger Bindung von zwei Substanzen

Bestimmung der Löslichkeit in 0.1% Albuminlösung, p_H 7.4
(je 10 Bestimmungen)

µg Substanz[1] je mg Albumin, in Gegenwart von Substanz[2]

2 \ 1	2,2'-DCB	2,5,2'5'-TCB	Dieldrin	Lindan
2,2'-DCB	3.23 ± 0.53 (1.00)(x)	2.91 ± 0.31 (0.69)	0.48 ± 0.07 (0.087) NS	1.66 ± 0.18 (0.39)
2,5,2'5'-TCB	2.96 ± 0.35 (0.92) NS	3.79 ± 0.34 (0.90)	0.49 ± 0.11 (0.088) NS	—
Dieldrin	1.73 ± 0.44 (0.54)	4.07 ± 0.40 (0. 97) NS	0.48 ± 0.02 (0.0 87)	—
Lindan	1.71 ± 0.21 (0.53)	—	—	3.32 ± 0.22 (0.78)

(x) Zahl der gebundenen Moleküle /Albuminmolekül

N S : Keine signifikante Abweichung ($P > 0.05$)

in die Poren des Gels eindringen können, herauschromatographiert. Nach Elution der eiweißhaltigen Fraktionen bildet die Substanzkonzentration eine Plateauzone, deren Höhe der Konzentration des freien Anteils in der Proteinlösung entspricht.
Bei den Versuchen mit 2,2'-Dichlorbiphenyl konnte die Ausbildung eines derartigen Konzentrationsplateaus beobachtet werden (Abb.5).
Allerdings waren die erhaltenen Werte relativ schlecht reproduzierbar. Als Ursache ist die hohe Adsorption an das Gelmaterial anzunehmen. Es zeigte sich, daß 90 - 98% der in Puffer gelösten Menge irreversibel adsorbiert werden.
Bei Auftrag einer 1% Albuminlösung wurde ein gebundener Anteil von 98.2% ermittelt. Dieser Wert stimmt mit dem bei der Dialyse bei gleicher Temperatur (22°C) erhaltenen Wert von 96.1% gut überein.
Das Verfahren erwies sich jedoch für höherchlorierte Biphenyle als ungeeignet, da bei diesen vermutlich die Adsorption an das Gel stärker in Erscheinung tritt. In den eiweißfreien Fraktionen wurden nur Spuren gefunden. Ein Konzentrationsplateau wurde nicht beobachtet.
Die andere Möglichkeit der Bestimmung (Hummel & Dreyer,1962) besteht darin, daß die Säule vor Auftrag der Proteinlösung mit der untersuchten Substanz equilibriert wird.
Während die Proteinmoleküle über die Säule wandern, nehmen sie bis zur Gleichgewichtseinstellung Substanzmoleküle aus der Lösung auf. Demzufolge steigt die Substanzkonzentration in den eiweißhaltigen Fraktionen an und sinkt in den darauffolgenden Fraktionen unter das Ausgangsniveau. Die Fläche des Konzentrationspeaks entspricht quantitativ der gebundenen Menge.
In 30 Einzelversuchen mit verschieden großen Säulen, wobei Auftragsvolumen, aufgetragene Proteinmenge und Elutionsgeschwindigkeit variiert wurden, kam es in allen Fällen zu dem beschriebenen Konzentrationsanstieg in den eiweißhaltigen Fraktionen (Abb.6). In den nachfolgenden Fraktionen war die PCB-Konzentration gegenüber den Fraktionen vor Elution der Proteine meist leicht erhöht.
Tab. 5 zeigt die Ergebnisse von 14 Versuchen, bei denen Auftragsvolumen und aufgetragene Proteinmenge variiert wurden.
Die hohe Adsorption an das Sephadexgel erlaubte es allerdings nicht, die Säule zu equilibrieren. Die Konzentration von 2,2'-Dichlorbiphenyl im

Abb. 5

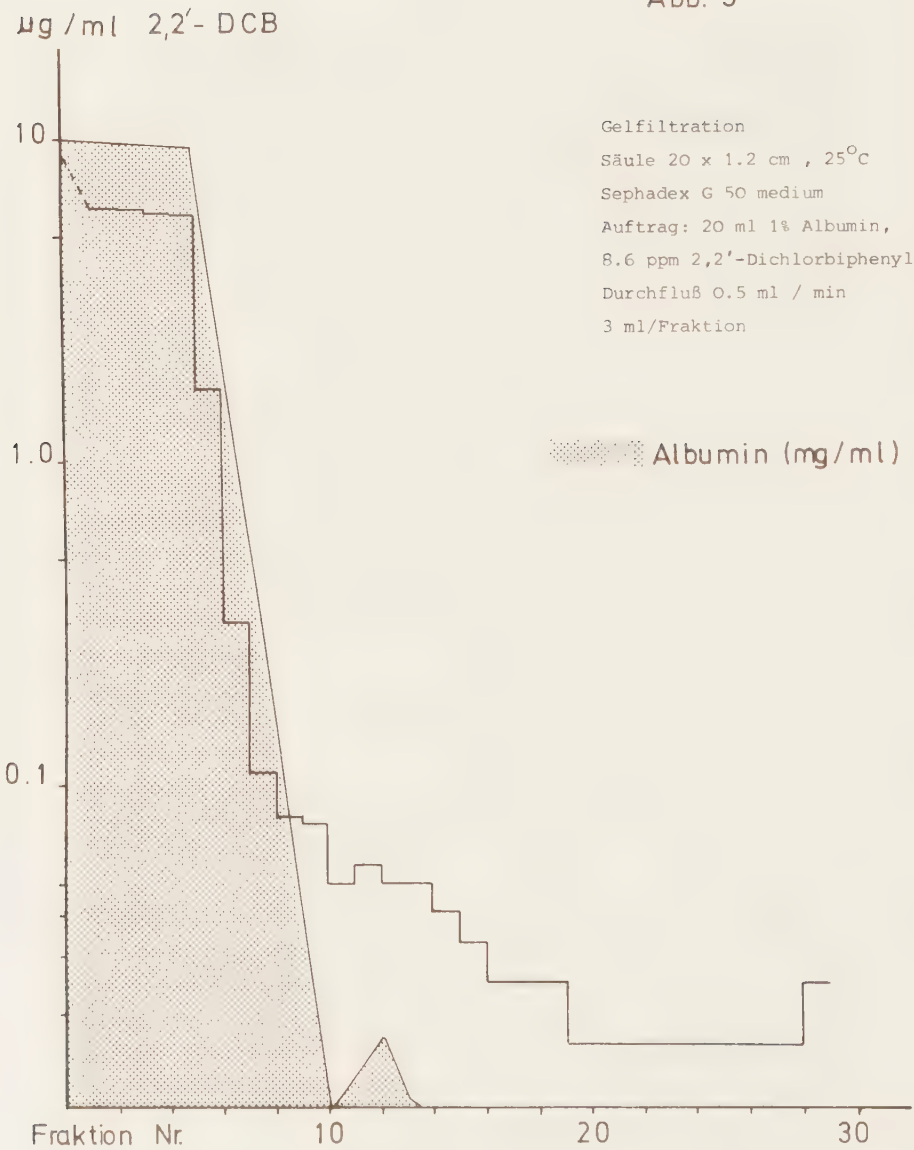
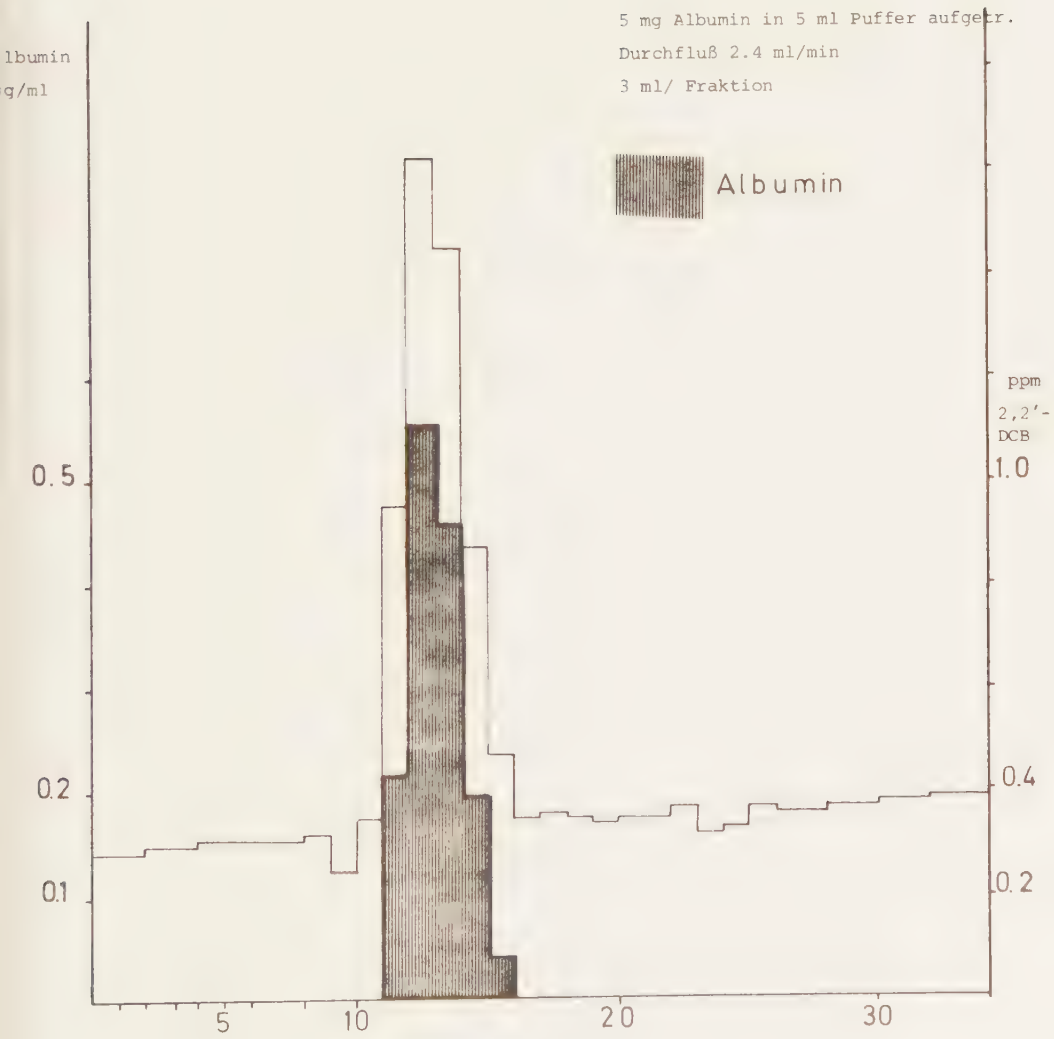

µg / ml 2,2'- DCB
10
1.0
0.1
Gelfiltration
Säule 20 x 1.2 cm , 25°C
Sephadex G 50 medium
Auftrag: 20 ml 1% Albumin,
8.6 ppm 2,2'-Dichlorbiphenyl
Durchfluß 0.5 ml / min
3 ml/Fraktion
Albumin (mg/ml)
Fraktion Nr.
10
20
30

Abb. 6


Gelfiltration
Säule 2 x 30 cm, 22°C
Sephadex G 50 medium
5 mg Albumin in 5 ml Puffer aufgetr.
Durchfluß 2.4 ml/min
3 ml/ Fraktion
Albumin
lbumin
g/ml
0.5
0.2
0.1
ppm
2,2'-
DCB
1.0
0.4
0.2
5
10
20
30

Tab. 5

Gelfiltration

Bestimmung der Bindung von 2,2'-Dichlorbiphenyl an Albumin

22°C

Auftragsvolumen (ml)	Albumin aufgetr. (mg)	2,2'-DCB frei (µg/ ml)	2,2'DCB geb (µg/ mg	r *	% gebunden
1	1	0.17	2.71	0.8	94%
1	1	0.016	0.86	0.27	98.2%
1	1	0.13	1.87	0.58	93.1%
5	5	0.12	1.35	0.43	91.2%
0.2	1.2	0.05	1.32	0.41	96.3%
0.2	1.2	0.05	3.12	0.98	98.4%
10	5	0.25	3.18	0.99	92.2%
10	5	0.2	2.91	0.7	92%
10	5	0.06	1.44	0.45	94.9%
10	5	0.13	2.47	0.77	94.7%
		0.03	1.15	0.36	97.4%
37°C					
10	5	0.07	1.26	0.39	94.5%
10	5	0.1	1.3	0.40	90.8 %
10	5	0.46	3.8	1.18	97.9%

* r = Moleküle 2,2'-DCB / Molekül Albumin

Eluat erreichte maximal 42 % der Konzentration in der Ausgangslösung, nachdem die Säule (0.8 x 100 cm) vorher mit 3 000 - 4 000 ml einer wässrigen Dichlorbiphenyllösung gespült worden war.
Der Versuch, das Sephadex-Gel in trockenem Zustand mit einer äthanol. Lösung von 2,2'-DCB zu imprägnieren, wobei eine Konzentration von 2000 µg/g , bezogen auf Trockengewicht, erreicht wurde, ergab gegenüber unbehandeltem Sephadex keine Verbesserung.
Die Adsorption ist weitgehend irreversibel; adsorbiertes Dichlorbiphenyl konnte mit Phosphatpuffer nicht mehr eluiert werden.
Die Verwendung von anderem Gelmaterial, wie Bio-Gel PX 10 (Bio-Rad) sowie Controlled-Pore-Glass CPG 10 (Serva) mit entsprechender Porengröße brachte hinsichtlich der Adsorptionseigenschaften ähnliche Ergebnisse. Besonders hohe Adsorptionsraten traten bei dem Controlled-Pore-Glass auf.
Vorversuche zeigten, daß die Methode für höherchlorierte Biphenyle nicht geeignet ist, da bei diesen die Adsorption an das Gel noch stärker in Erscheinung tritt.

3. Bindung von 2,2'-Dichlorbiphenyl an Serumglobuline

Eine vergleichende Untersuchung der Bindung von 2,2'-DCB an α-, β- und γ-Globuline wurde durch Bestimmung der Löslichkeit durchgeführt.
Dabei wurde festgestellt, daß 2,2'-DCB an die α- und β-Globulinfraktion, nicht aber an γ-Globuline gebunden wird (Tab.6) wobei die gebundene Menge (in µg 2,2'-DCB/mg Globulin) bei den α-Globulinen 80 $\pm$ 4.7% und bei den β-Globulinen 57.8 $\pm$ 5.3% der an Albumin gebundenen Menge beträgt. Die Umrechnung der Werte in Moleküle 2,2'-DCB/Molekül Protein erschien in diesem Fall nicht sinnvoll, da die verwendeten Globulinfraktionen nicht einheitlich sind und somit kein definiertes Molekulargewicht angegeben werden kann.
Ausgehend von elektrophoretisch ermittelten Werten für die Zusammensetzung des verwendeten Rinderplasmas (s.Tab.7) wurde die Bindungskapazität von Rinderplasma aufgrund der oben genannten Werte berechnet, wobei ein Durchschnittswert von 167 µg/ml erhalten wurde. Dieser theoretische Wert stimmt mit dem experimentellen Wert für die Bindung von 2,2'-DCB an Rinderplasma von 187.3 $\pm$ 12.5 µg/ml relativ gut überein.

Tab. 6a

Bindung von 2,2'-Dichlorbiphenyl an Plasmaproteine beim Rind (3°C, n = 5)

	mgProtein/ml	µg 2,2'-DCB/ mg Protein	% gebunden
Albumin (+)	1	3.49 ± 0.35	91.4
α- Globulin (+)	7.1	2.8 ± 0.16	99.5
β- Globulin (+)	4.9	2.02 ± 0.18	98.9
γ- Globulin (+)	7.6	0.006 ± 0.002	31.2

(+) aus Rinderserum, lyophil.,Serva

Tab. 6 b

Bindung an Rinderplasma (3°C, n= 5)

Substanz	mg Protein/ ml Plasma	µg /mg Protein	% gebunden
4-ClB	71	3.57 ± 0.16	99.9
2,2'-DCB	73.7	2.55 ± 0.17	99.4
2,5,2'5'-TCB	71	1.2 ± 0.14	99.8
2,4,6,2'4'6'- HCB	71	0.34 ± 0.08	99.9
Dieldrin	71	0.57 ± 0.06	99.9

Tab. 7 Zusammensetzung von Rinderplasma

	a	b
Gesamteiweißgehalt (mg/ml	74	70 (62 - 76)
Albumine, rel.%	53.3	41.9 (29.1 - 59.8)
Globuline		
α-Globuline, rel.%	8.4	15.1 (7.4 - 25.7)
β-Globuline	8.3	16.4 (6.2 - 26.0)
γ-Globuline	29	26.6 (12.3 - 40)

a = Eigene Unters.

b = Durchschnittswerte, nach Kolb, in Rauen,1968

4. Elektrophorese

Zur weiteren Charakterisierung der Transportfunktion einzelner Plasmaproteinfraktionen bzw. der Verteilung im Plasma wurde Rinderplasma bzw. Rattenserum und -plasma 30 Minuten bei 37°C mit 2,2'-DCB oder 2,5,2'5'-TCB inkubiert und anschließend auf Celluloseacetatfolien elektrophoretisch getrennt. Dabei wurden 4 - 5 Proteinfraktionen erhalten. Die Trennung in präparativem Maßstab unter Verwendung von Celluloseacetatblöcken ergab ähnliche Muster, wobei allerdings die einzelnen Banden weniger scharf begrenzt erschienen. Die Blöcke wurden anschliessend zerschnitten und die einzelnen Fraktionen getrennt aufgearbeitet. Dabei zeigte sich, daß sowohl bei direkter Extraktion durch Homogenisieren in Hexan als auch nach Auspressen und Auswaschen der Stücke mit Extraktion der wässrigen Proteinlösung maximal 5 - 10 % der eingesetzten Menge an PCB's und zwar hauptsächlich im Bereich der Auftragstelle der Probe, wiedergefunden wurden.

Die Extraktion mit Essigsäureäthylester war nicht möglich, da sich die Celluloseacetatfolien darin auflösen.

Der Einfluß des Trägermaterials auf die Extrahierbarkeit wurde untersucht. Bei Zusatz eines Celluloseacetat-Homogenats zu Rinderplasma, das 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl enthielt, konnten unmittelbar nach der Zugabe nur 40 - 50 % der aus Plasma extrahierbaren Menge gewonnen werden.

Es wurde daher versucht, den Nachweis der Substanzen unter Verwendung von ^{14}C-markierten Verbindungen ohne Extraktion direkt in der Folie zu führen. Hierzu wurden ^{14}C-2,2'-Dichlorbiphenyl und ^{14}C-Dieldrin und Rinderplasma sowie Rattenplasma und -serum verwendet.
Der Nachweis durch Dünnschicht-Scanning bzw. Kontaktautoradiographie ergab, daß nur an der Stelle des Auftrags der Probe Dichlorbiphenyl bzw. Dieldrin vorhanden waren. Im Bereich der Proteinbanden war keine Radioaktivität nachweisbar.
Um die Möglichkeit einer Bindung an Plasmabestandteile, die im elektrischen Feld nicht wandern, wie Lipidtröpfchen, auszuschließen, wurden die gleichen Versuche mit einer 1% Lösung von Rinderserumalbumin (Serva, krist,reinst) durchgeführt.
In keinem Fall war in den Proteinfraktionen nachweisbare Aktivität vorhanden, während an der Stelle des Auftrags stets ein größerer Peak auftrat.
In weiteren Versuchen wurde die Celluloseacetatfolie mit einer äthanol. Lösung von Dichlorbiphenyl getränkt und das Äthanol anschließend mit Elektrophoresepuffer ausgewaschen. Bei diesen Versuchen war das Ergebnis gleichfalls negativ, ebenso bei Verwendung von Filtrierpapier als Trägermaterial.

5. Verteilung von PCB's im Blut

Bei den Versuchen mit Rinderblut in vitro wurde festgestellt, daß die polychlorierten Biphenyle auch in die zellulären Bestandteile des Blutes eindringen und mit diesen transportiert werden.
Mit Ausnahme von 2,2'-Dichlorbiphenyl, das sich annähernd gleichmäßig zwischen Blutzellen und Plasma verteilt, zeigen die polychlorierten Biphenyle sowie Dieldrin und DDT ähnliche Verteilungsmuster.
Tab.8 enthält die Konzentrationen in Plasma, Blutzellen und Zellplasma. Die Konzentrationsangaben sind, wenn nicht anders angegeben, auf ug/ml Plasma bzw. ug/ml Blutzellen bezogen.
Die prozentuale Verteilung im Blut wurde berechnet, wobei der Volumenanteil des Blutplasmas mit 60% und der der Blutzellen mit 40% zugrundegelegt wurde.
Die Verteilungsmuster sind in Abb.7 dargestellt. Während beim 2,2'-DCB nur 56% der Gesamtmenge im Plasma transportiert werden, bleiben bei den

Tab. 8

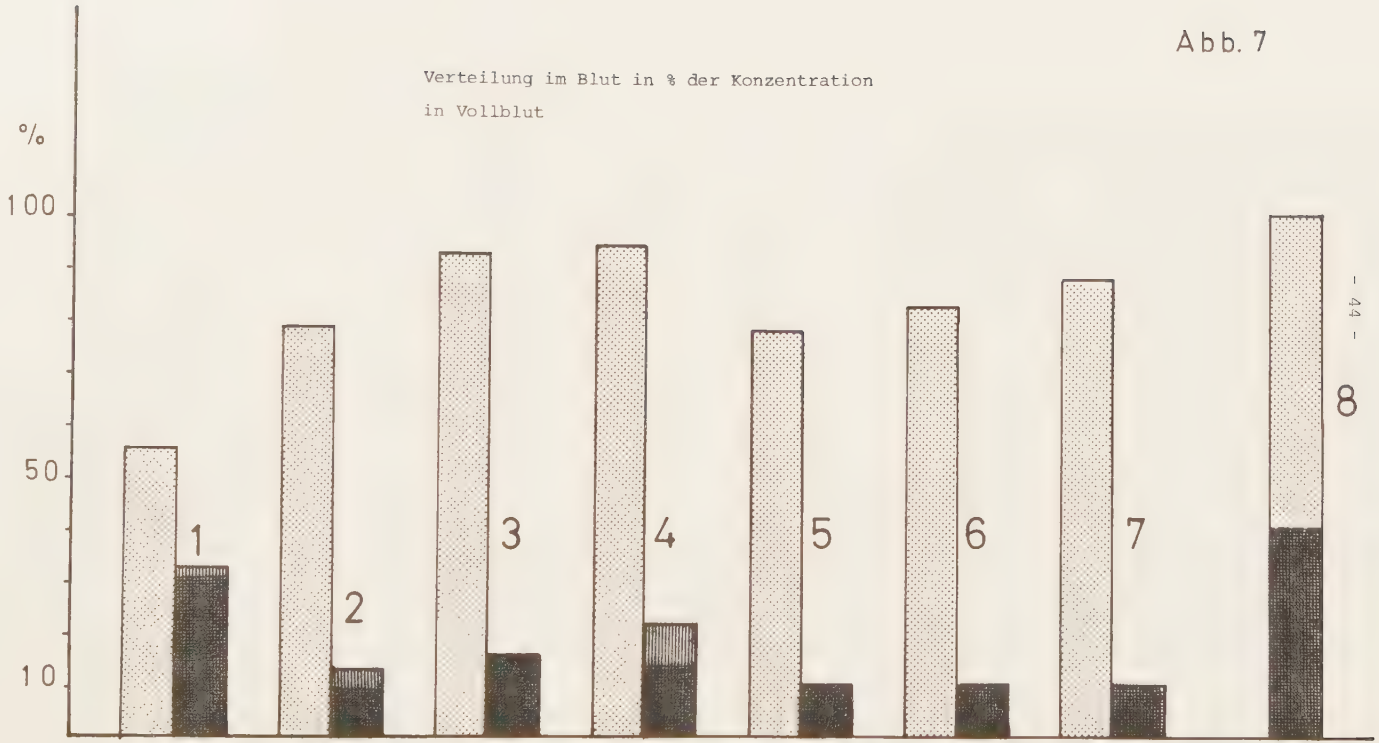
Verteilung polychlorierter Biphenyle und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide zwischen Plasma und Blutzellen in vitro (Rinderblut, 37°C ; 60 Vol.% Plasma)

Substanz	n	Blut µg/ml	Plasma µg/ml	% im Plasma rel. zu Blut	Blutzellen µg/ml	% in Zellen rel. zu Blut	Zellinhalt µg/ ml
2,2'-DCB	20	4.86 ± 0.51	4.52 ± 0.39	55.8 %	4.0 ± 0.76	32.9 %	3.8 ± 0.92
2,5,2'5'-TCB	6	3.97 ± 0.32	5.23 ± 0.58	79 %	1.34 ± 0.5	13.5 %	0.96 ± 0.1
2,3,4,5, 2'3'-HCB	7	4.68 ± 0.58	7.3 ± 1.64	93.6 %	1.88 ± 0.42	16.06 %	1.68 ± 0.36
2,4,6, 2'4'6'-HCB	6	3.79 ± 0.29	5.97 ± 0.71	94.5 %	2.14 ± 0.6	22.5 %	1.32 ± 0.1
Clophen A 30	6	5.28 ± 0.55	6.85 ± 0.73	77.8 %	1.38 ± 0.38	10.4 %	1.28 ± 0.36
Dieldrin	6	4.8 ± 0.29	6.6 ± 0.46	82.5 %	1.74 ± 0.14	14.5 %	1.86 ± 0.34
p,p'-DDT	9	4.92 ± 0.67	7.19 ± 0.99	87.7 %	1.28 ± 0.16	10.4 %	1.16 ± 0.2

n = Anzahl der Versuche

Abb. 7

Verteilung im Blut in % der Konzentration in Vollblut



1 2,2' -Dichlorbiphenyl
2 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl
3 2,3,4,5, 2'3'-Hexachlorbiphenyl
4 2,4,6,2'4'6'-Hexachlorbiphenyl
5 Clophen A 30
6 Dieldrin
7 DDT
8 Zusammensetzung von Rinderblut

Plasma

Zellinhalt } Blutzellen

höherchlorierten Biphenylen, sowie Clophen A 30, Dieldrin und DDT 78 - 94 % im Plasma. Die Blutzellen enthalten dementsprechend zwischen 6 und 44% % der Gesamtmenge.
Die gemessenen Werte für die Blutzellen liegen mit 10 - 33 % etwas niedriger, da die Wiederfindungsrate bei getrennter Aufarbeitung von Plasma und Zellen gegenüber Gesamtblut um 8 - 12 % niedriger war. Verluste entstehen wahrscheinlich beim Waschen der Blutzellen durch Auswaschen von membrangebundenen Anteilen.
Die Konzentration in den Zellmembranen und in Leukozyten reichte für eine gaschromatographische Bestimmung nicht aus. Da ^{14}C-markierte Verbindungen für diese Versuche nicht zur Verfügung standen, wurde auf die Isolierung und Untersuchung von Leukozyten verzichtet.
Kontrollversuchem bei denen nach dem Zentrifugieren die Leukozytenfraktion entfernt wurde, ergaben keinen Unterschied zu der gesamten Zellfraktion; ein nennenswerter Beitrag zum Transport im Blut ist daher nicht zu erwarten.
Der Gehalt der Zellmembranen an PCB's wurde indirekt durch Zentrifugieren von hämolysierten Blutzellen und Untersuchung des mebranfreien Überstands bestimmt. Dabei wurde festgestellt, daß zwischen 5 und 40% der in Blutzellen enthaltenen Menge in den Zellmembranen enthalten sind.
Das Verteilungsmuster von 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl zeigte in einem Konzentrationsbereich zwischen 4 und 40 ppm keine Änderung in Abhängigkeit von der Konzentration (Tab.9). Die Untersuchung bei noch höheren Konzentrationen erschien nicht sinnvoll, da der Gehalt von PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden im Blut unter natürlichen Bedingungen kaum jemals höhere Werte als 1 ppm erreicht.
Die Abhängigkeit der Verteilung im Blut von der Proteinkonzentration im Plasma wurde für 2,2'-DCB und 2,5,2'5'-TCB untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, welcher Zusammenhang zwischen der Proteinbindung im Plasma und der Verteilung zwischen Plasma und Blutzellen besteht. Die Plasmaproteine wurden durch Zentrifugieren und Waschen der Blutzellen entfernt. Das ursprüngliche Volumen wurde durch Auffüllen mit Phosphatpuffer wiederhergestellt.
Im physiologischen Bereich zwischen 60 und 80 mg Protein/ ml Plasma blieb das Verteilungsmuster praktisch unverändert (Tab.10). Erst bei

Tab. 9

Verteilung von 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl im Blut in Abhängigkeit von der Konzentration (Rinderblut, 37° C)

zugesetzt µg/ml	n	Blut µg/ml	% d. zuges. Konz.	Plasma µg/ ml	% in Plasma rel. zu Blut	Blutzellen µg/ml	% in Zellen rel. zu Blut
4	6	3.97 ± 0.32	99.25 %	5.23 ± 0.58	79.0 ± 8.8%	1.34 ± 0.5	6.7 ± 2.5%
10	2	8.85 ± 0.64	88.5 %	6.67 ± 0.39	45.2 ± 2.6%	2.28 ± 0.16	5.1 ± 0.4%
20	1	18.87	94.3%	12.62	40 %	3.60	3.8 %
40	3	40.5 ± 4.14	101.25 %	36.6 ± 8.2	54 ± 12.1 %	9.86 ± 0.8	4.9 ± 0.39 %

n = Anzahl der Versuche

Abb. 8

PCB-Gehalt in Blutzellen, relativ zu Vollblut in Abhängigkeit von der Proteinkonzentation im Plasma

Tab. 10

Verteilung von 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl im Blut in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Plasma (Rinderblut, 37°C; 60 Vol.% Plasma)

mg Protein/ ml Plasma	Blut (µg/ml)	Plasma (µg/ml)	% in Plasma rel. zu Blut	µg TCB/ mg Protein	Blutzellen (µg/ml)	Zellinhalt (µg/ml)
1.9	4.40	1.03	14.04%	0.54	8.0	6.56
2.3	4.3	1.00	13.9%	0.43	7.52	7.4
4.0	4.4	1.71	23.3%	0.42	7.2	5.6
16.7	4.2	4.2	60 %	0.25	3.2	2.86
24.5	3.80	3.80	60 %	0.155	2.36	2.36
36.9	3.84	5.40	84.4 %	0.146	1.60	0.94
67.4	3.88	5.36	82.9 %	0.079	1.04	0.92
69.0	4.00	5.10	76.5 %	0.073	1.04	0.92
73.5	3.64	4.56	75.16 %	0.062	1.04	0.90

weiterer Erniedrigung der Proteinkonzentration nimmt die Konzentration in den Blutzellen zu, während die PCB-Konzentration im Plasma abnimmt. Im Bereich zwischen 24 und 1.9 mg/ml nimmt die Konzentration in den Blutzellen nahezu proportional zur Abnahme der Proteinkonzentration zu. Bei einer Proteinkonzentration von 2 - 4 mg/ml wurden 90 - 95% der Gesamtmenge an 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl bzw. 2,2'-Dichlorbiphenyl in den Blutzellen gefunden.(Abb.8).

6. Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von körperfremden Substanzen, z.B. Pharmaka, stellt ein Maß für die Lipophilie dieser Stoffe dar und erlaubt bis zu einem gewissen Grad Vorhersagen über die Verteilung im Organismus (Krieglstein,1973). Tab,11 zeigt die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten für verschiedene polychlorierte Biphenyle, sowie DDT und Dieldrin. Die Berechnung erfolgte nach:

$$k = \frac{c_O}{c_W} .$$

c_O = Konzentration in der Octanol-Phase
c_W = Konzentration in der wässrigen Phase (in mg/l)

Die Abnahme der Konzentration in der Octanol-Phase durch Übertritt in die wässrige Phase wurde bei der Berechnung vernachlässigt, da $c_O \gg c_W$. Der niedrigste Wert wurde für 4-Chlorbiphenyl gefunden. 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl hat den höchsten Verteilungskoeffizienten der untersuchten Verbindungen.

7. Kinetik der Verteilung und Ausscheidung von 2,2'-DCB bei Ratten

7.1. Blutspiegelkurve und Halbwertszeit

Der Blutspiegel von 2,2'-Dichlorbiphenyl steigt bei Ratten nach oraler Verabreichung rasch an und erreicht bereits nach einer Stunde den höchsten Wert (Abb.9).
Nach Dost (1968) entspricht der Kurvenverlauf bei oraler Applikation einer Bateman-Funktion (Gl.1) wobei Invasions- und Eliminationsfunktion überlagert sind. Wenn aber die Invasionskonstante k_1 sehr viel größer ist als die Eliminationskonstante k_2 , dann kann der Eliminationsvorgang nach einer gewissen Zeit mit hinreichender Genauigkeit durch eine ein-

Tab. 11

Octanol/Wasser - Verteilungskoeffizienten (22° C)

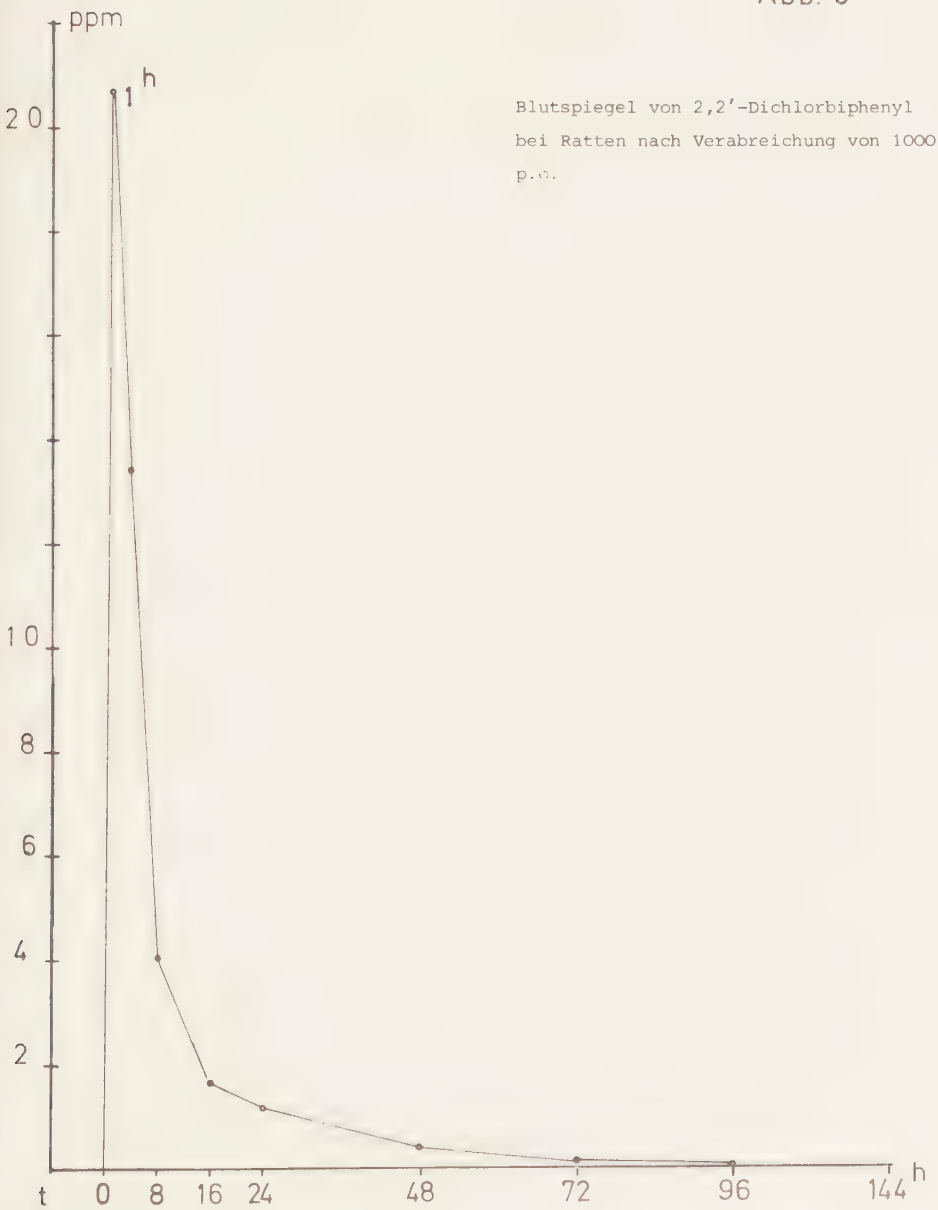
c_O = 5 00 (mg/ l)

Substanz	c_W (mg/l)	k
4-Chlorbiphenyl	o.o255 ± o.oo2	19 600
2,2'-Dichlorb.	o.oo64 ± o.ooo4	77 300
2,5,2'5'-Tetrachlorb.	o.oo11 ± o.ooo2	424 900
2,3,4,5,2'3'-Hexachlorb.	o.oo245 ± o.ooo5	204 000
2,4,6,2'4'6'-Hexachlorb.	o.oo16 ± o.oooo4	309 900
Dieldrin	o.oo59 ± o.oo1	83 700
DDT	o.oo19 ± o.ooo5	251 500

c_O = Konzentration in Octanol (mg/l)

c_W = Konzentration in Wasser (mg/l)

Abb. 9



Blutspiegel von 2,2'-Dichlorbiphenyl bei Ratten nach Verabreichung von 1000 mg/kg p.o.

fache Exponentialfunktion (Gl.2) beschrieben werden. Die Eliminationskonstante ergibt sich nach Gl.3.

Gl.1 $$y = \frac{a\,k_1}{k_2 - k_1}\,(e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}).$$

Gl.2 $$y = a \cdot e^{-k_2 t}.$$

Gl.3 $$k_2 = \frac{\ln y_1 - \ln y_2}{t_2 - t_1}.$$

y = Konzentration im Blut zur Zeit t
a = fiktive Konzentration im Blut zur Zeit t = 0
k_1 = Invasionskonstante
k_2 = Eliminationskonstante

Wie die graphische Darstellung in halblogarithmischem Auftrag zeigt, geht die Blutspiegelkurve nach etwa 4 Stunden in eine biphasische Eliminationskurve mit exponentialem Verlauf über (Abb.10).
Die Halbwertszeit, entnommen aus der graphischen Darstellung, beträgt in der Zeit zwischen 4 und 8 Stunden, entsprechend der Phase rascher Elimination, 1.6 Stunden (k_{21}= 0.44 h^{-1}). Die Halbwertszeit in der zweiten, langsamen Eliminationsphase beträgt 14 Stunden, die zugehörige Eliminationskonstante k_{22}hat den Wert k_{22}= 0.049 h^{-1}.
Bereits 144 Stunden nach der Verabreichung war im Blut kein 2,2'-Dichlorbiphenyl mehr nachweisbar (Erfassungsgrenze 0.0.1 ppm).

7.2. Organverteilung

In Tab. 12 sind die Organkonzentrationen zu verschiedenen Zeiten nach der Verabreichung zusammengefasst. Während der ersten acht Stunden wurden erhebliche Streuungen beobachtet, die sehr wahrscheinlich auf unterschiedliche Resorptionsraten und Störungen der Resorption durch die Verabreichung der sehr hohen Einzeldosis, die in Hinblick auf die erwähnten klinisch - chemischen Untersuchungen gewählt worden war, zurückzuführen ist. Für diese Annahme spricht auch die unterschiedliche Aus-

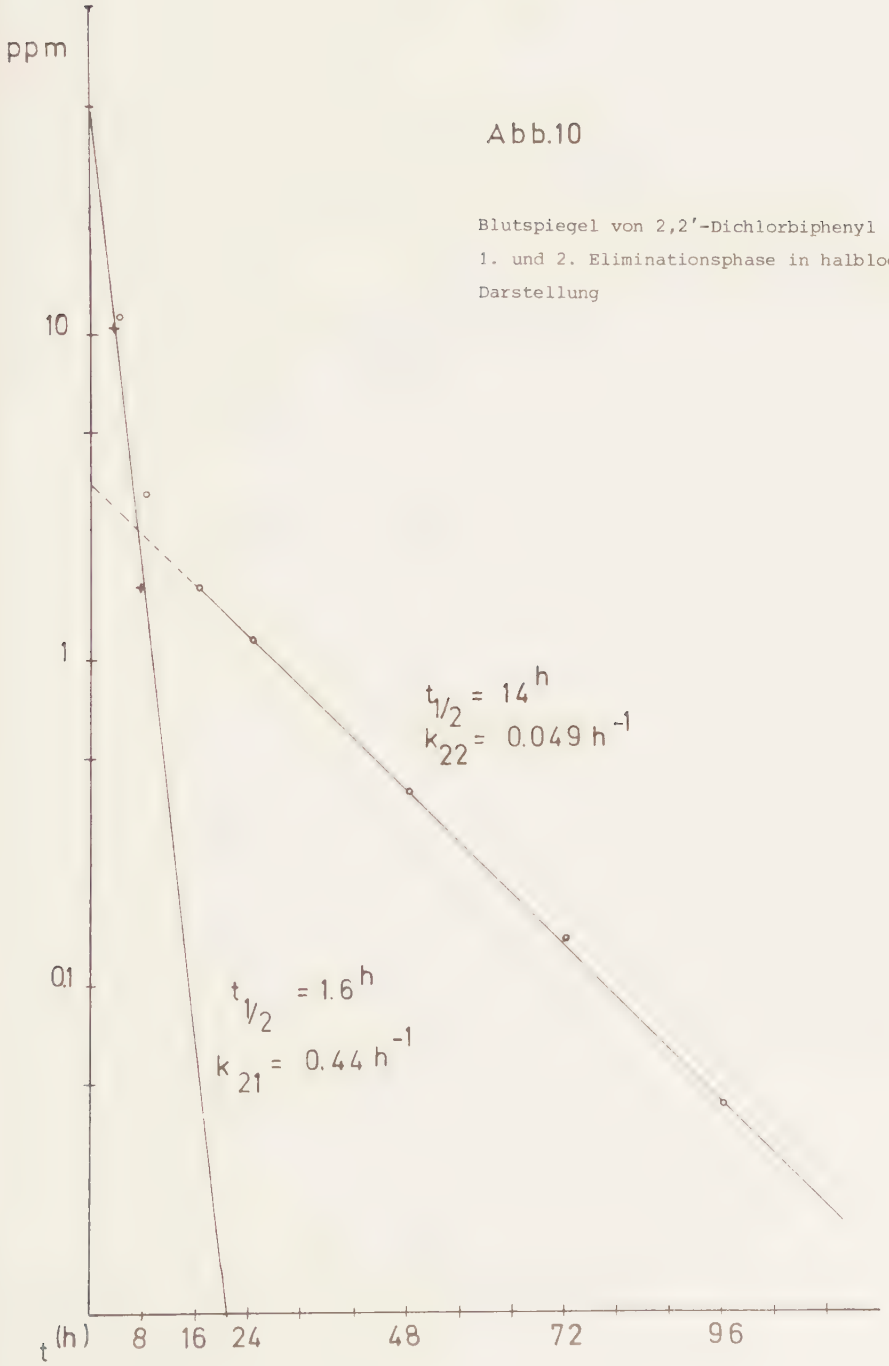


Abb.10

Blutspiegel von 2,2'-Dichlorbiphenyl
1. und 2. Eliminationsphase in halblog. Darstellung

Tab. 12

Verteilung von 2,2'-Dichlorbiphenyl in Geweben und Organen von Ratten in Abhängigkeit von der Zeit nach Verabreichung von 1 000 mg/kg in Olivenöl p.o. (µg/mg, bez. auf Frischgewicht)
(je 5 Einzelbestimmungen)

t (h)	Leber	Niere	Gehirn	Fettgewebe
1	303.9 ± 102.3	91.33 ± 27.3	66.8 ± 4.4	127.8 ± 47.9
2	25.6 ± 2.7	50.1 + 15.2	69.0 ± 73.1	180.0 ± 65.5
4	219.6 ± 100.3	55.5 ± 21.7	53.0 ± 43.6	474.9 + 310.2
8	17.9 ± 5.5	51.1 ± 5.5	10.8 ± 1.4	638.2 ± 131.8
16	6.2 ± 2.0	24.0 ± 4.2	2.7 ± 0.7	406.5 ± 129.1
24	3.9 ± 1.0	33.1 ± 5.8	3.0 ± 1.2	693.4 ± 280.5
48	1.6 ± 0.8	8.7 ± 8.3	0.8 ± 0.3	180.0 ± 73.5
72	0.27 ± 0.12	1.2 ± 0.8	0.3 ± 0.15	54.7 ± 25.3
96	0.08 ± 0.06	0.5 ± 0.4	0.05± 0.02	7.35 ± 1.34
168	N	N	N	1.1 ± 0.8

t (h)	Herzmuskel	Skelettmuskel	Milz	Lunge
16	3.0 ± 0.5	18.7 ± 12.7	2.2 ± 0.4	3.7 ± 0.8
24	4.5 ± 1.3	2.5 ± 0.7	2.0 ± 0.4	1.5 ± 0.4
48	1.0 ± 0.2	6.1 ± 0.7	0.8 ± 0.5	0.5 ± 0.4
72	0.2 ± 0.1	0,2 ± 0.1	0.19 ± 0.17	N
96	0.04 ± 0.02	0.1 ± 0.05	0.1 ± 0.1	N

N = Spuren, quantitativ nicht mehr erfassbar

scheidung im Kot und dessen erhöhter Wassergehalt (vgl.7.3.).
Die Dosis von 1 000 mg/kg dürfte im Bereich der akuten Toxizität liegen. Die Versuchstiere waren während der ersten Stunden nach der Verabreichung apathisch und reagierten kaum auf Umweltreize, wie Geräusche und Berührung, erholten sich jedoch im Verlauf von 24 Stunden vollständig.
Kontrolltiere, die die gleiche Menge Olivenöl ohne 2,2'-DCB erhalten hatten, zeigten demgegenüber keine Beeinträchtigung.
In den Organen von Kontrolltieren konnten keine polychlorierten Biphenyle nachgewiesen werden, jedoch enthielt die Leber durchschnittlich 30 ng/g, Fettgewebe bis zu 430 ng/g (bez. auf Frischgewicht) Hexachlorbenzol. Als Quelle ist das Fertigfutter (Altromin), mit dem die Tiere gefüttert wurden, anzusehen, da in diesem durchschnittlich 160 ng/g Hexachlorbenzol gefunden wurden.
Die Resorption von 2,2'-Dichlorbiphenyl im Darm erfolgt offensichtlich sehr rasch, da bereits nach einer Stunde im Blut und in der Leber die höchste Konzentration erreicht wird.
In der Leber wurde während der ersten 16 Stunden ein schneller Konzentrationsabfall ($t\ 1/2 = 2$ h, $k_{21} = 0.37\ h^{-1}$) beobachtet, der vermutlich einer Umverteilung in das Fettgewebe entspricht. Im Fettgewebe steigt die Konzentration langsamer an und erreicht ihr Maximum erst nach 16 - 24 h. Im nachfolgenden Zeitraum nimmt die Konzentration in der Leber langsamer ab ($t\ 1/2 = 13$ h, $k_{22} = 0.037\ h^{-1}$), wobei die Elimination durch Metabolisierung und Ausscheidung in den Vordergrund tritt.
In Abb.11 ist der Konzentrationsverlauf in den untersuchten Organen in Abhängigkeit von der Zeit in Prozent der jeweiligen Maximalkonzentration dargestellt.
Nach 6 Tagen sind nur noch im Fettgewebe bestimmbare Mengen an 2,2'-DCB vorhanden. Die Nachweisgrenze für die quantitative Bestimmung liegt im Bereich zwischen 10 - 20 ng/g , bezogen auf Frischgewicht.

7.3. Nachweis der Metaboliten von 2,2'-Dichlorbiphenyl

In einer Kotprobe, die über 24 Stunden im Stoffwechselkäfig gesammelt worden war, wurden 77 µg/g (bezogen auf Trockensubstanz), entsprechend 147 µg, gefunden. Daneben traten im Gaschromatogramm zwei Peaks auf, die in Kontrollproben nicht beobachtet wurden (Abb.12).

Abb.11

Organkonzentration in % der jeweiligen Maximalkonzentratio

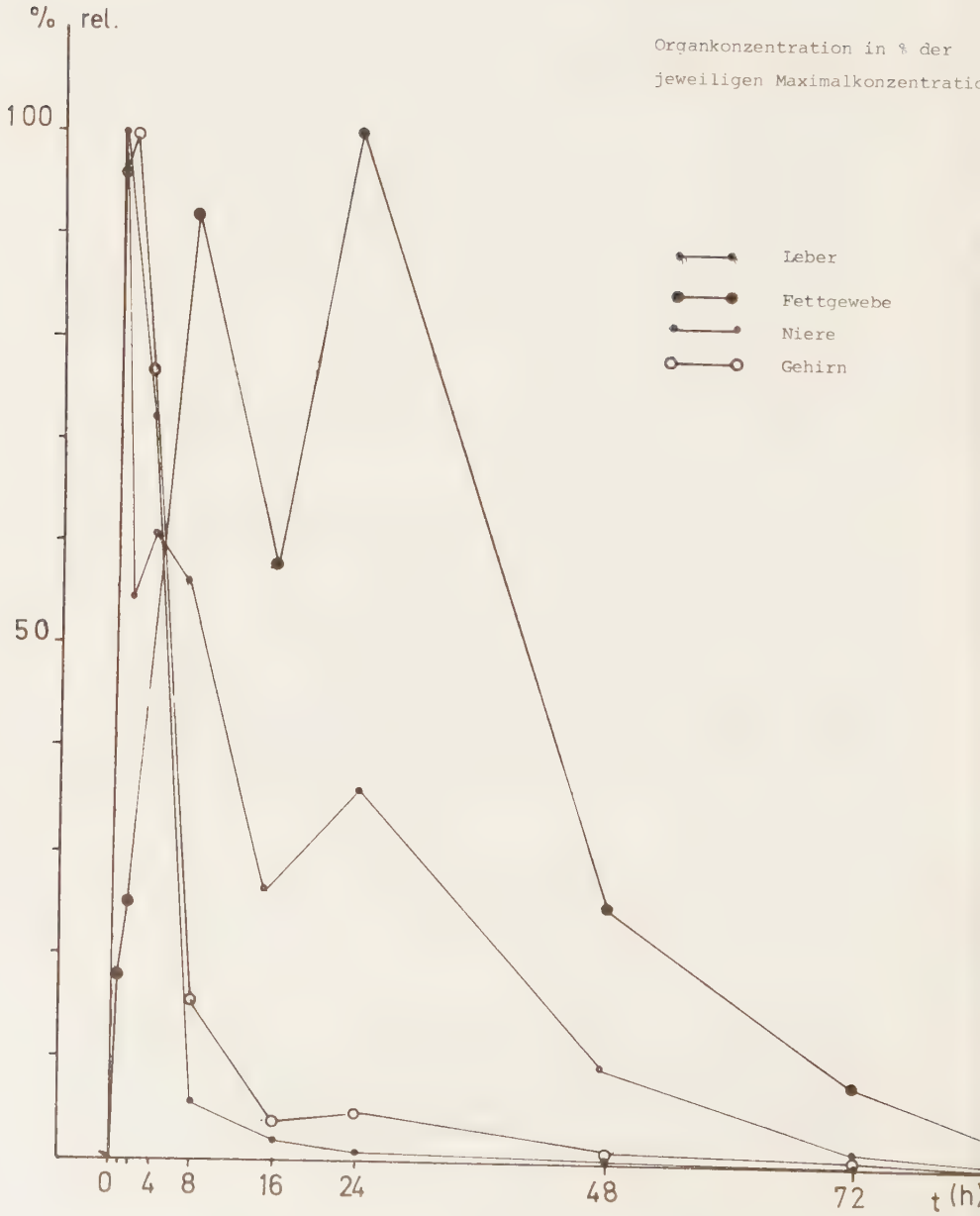


Abb.12

Metaboliten von 2,2'-Dichlorbiphenyl im Kot von Ratten (GC)

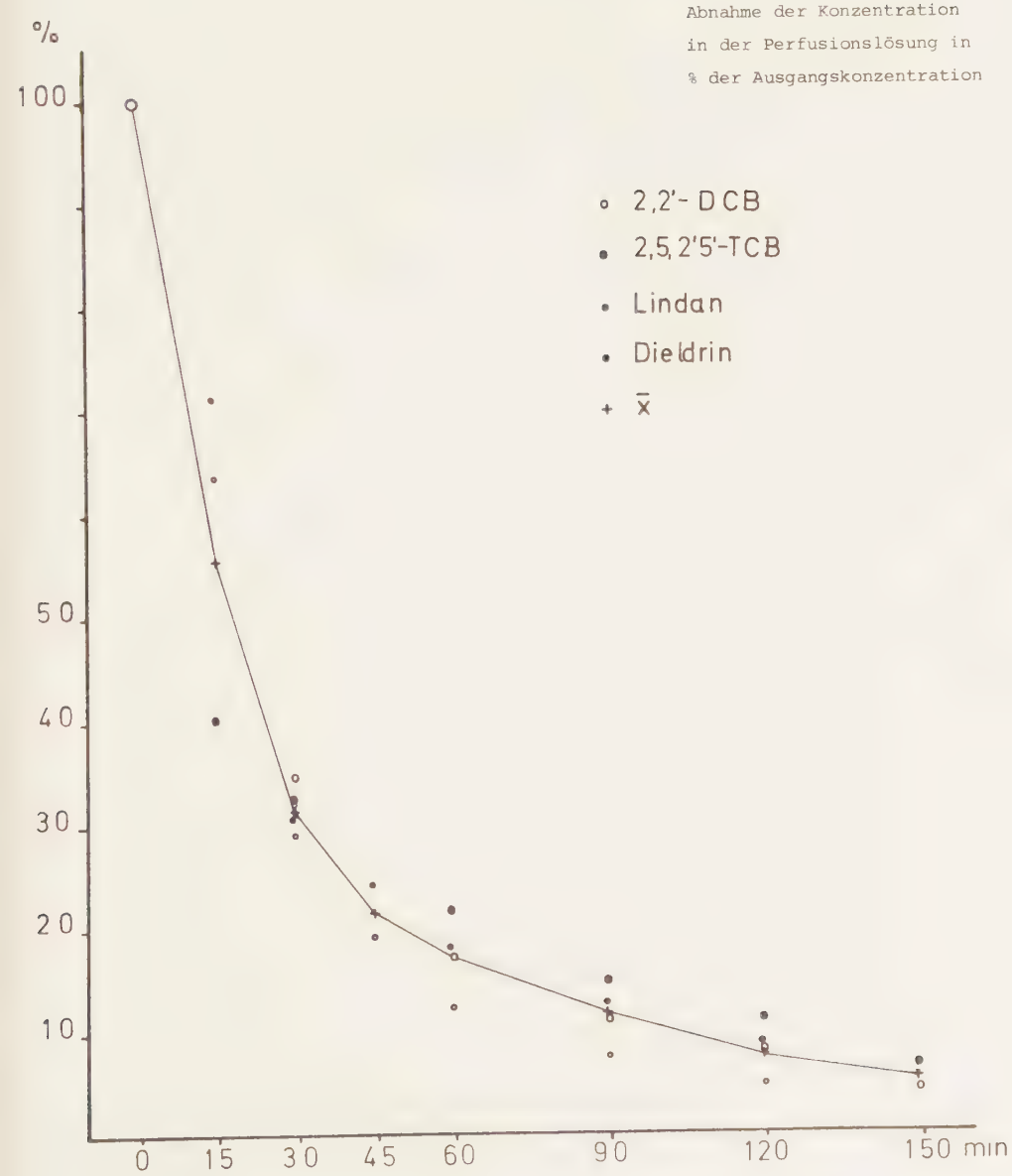
Die massenspektrometrische Untersuchung ergab bei beiden Verbindungen ein Molekulargewicht von 238. Dies entspricht dem Monohydroxydichlorbiphenyl; es wird daher vermutet, daß es sich bei diesen Substanzen um Monohydroxydichlorbiphenyle handelt.
Eine nähere Identifizierung und quantitative Bestimmung der Metaboliten war nicht möglich, da keine Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen.
Die Ausscheidungsrate von unverändertem Dichlorbiphenyl war uneinheitlich. In einer weiteren Kotprobe von 2 Tieren wurden nach 24 Stunden 4.8 µg/g, nach 48 Stunden 27 µg/g (bez. auf Trockensubstanz) 2,2'-DCB gefunden.
Der Wassergehalt der Kotproben betrug während der ersten 24 Stunden 55 - 88% gegenüber 62% nach 24 - 48 Stunden. Im Zeitraum zwischen 72 h und 168 h sank der Wassergehalt auf 32 - 40% und war damit gegenüber den KOntrollen praktisch unverändert.
Im Harn wurden ebenfalls die beiden Metaboliten nachgewiesen, jedoch kein unverändertes Dichlorbiphenyl.
Das Verhältnis der beiden Metaboliten I und II (berechnet aus dem Verhältnis der Peakflächen) betrug im Kot etwa 3.5 : 1. im Harn dagegen 1.2 : 1.

8. Aufnahme in die isoliert perfundierte Leber

Die Versuche mit der isoliert perfundierten Leber von Ratten wurden mit 2,2'-Dichlorbiphenyl, 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl, Dieldrin und Lindan durchgeführt. Die Anfangskonzentration in der Perfusionslösung (Plasma/Puffer 1 : 1, 35 - 40 mg Protein/ml) betrug 5 ppm. Mit jeder Substanz wurden zwei Versuche durchgeführt.
Abb. 13 zeigt die Konzentrationsabnahme in der Perfusionslösung in Prozent der Ausgangskonzentration (Mittelwert von 2 Versuchen).
Dabei wurde festgestellt, daß sowohl PCB's als auch Dieldrin und Lindan mit nahezu gleicher Geschwindigkeit in die Leber aufgenommen werden.
Ein Zusammenhang mit der Proteinbindung bzw. den Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der einzelnen Substanzen und der Geschwindigkeit der Aufnahme in die Leber war nicht erkennbar.
Die Konzentration in der Perfusionslösung sinkt innerhalb der ersten 15-18 Minuten auf 50 % der Ausgangskonzentration. Nach 120 Minuten beträgt die Konzentration nur noch 5 - 10 %.

Abb.13

Leberperfusion
Abnahme der Konzentration
in der Perfusionslösung in
% der Ausgangskonzentration



Versuche mit einem zellhaltigen Perfusionsmedium (Vollblut/Puffer 1 : 2) zeigten eine grundsätzliche Übereinstimmung im Kurvenverlauf, wobei allerdings eine scheinbare Konzentrationsabnahme durch Entmischung der Perfusionslösung zu berücksichtigen war.
In Kontrollversuchen ohne Leber wurde außerdem festgestellt, daß infolge von Adsorption an die Gefäßwände während der Versuchsdauer von 120 - 150 Minuten in der Perfusionslösung eine Konzentrationsabnahme von ca. 10 % auftritt.

D Diskussion

1. Proteinbindung

Seit den ersten Arbeiten von Bennhold (1923 - 26) über die Adsorption von Kongorot an Serumalbumine ist die Bindung von im Blut gelösten Stoffen an Serumproteine in großem Umfang untersucht worden.
Dabei zeigte sich, daß sowohl Stoffe endogenen Ursprungs als auch die meisten Fremdstoffe an Proteine gebunden werden, wobei Stoffe mit pharmakologischer Bedeutung, wie Sulfonamide, Antibiotika etc. besonders gründlich untersucht wurden (Goldstein,1949, Klotz,1949, Meyer, 1968).
Die Bedeutung der Proteinbindung ist in erster Linie in der Funktion der Proteinmoleküle als Transportvehikel zu sehen. Daneben werden in vielen Fällen die pharmakokinetischen Eigenschaften des gebundenen Stoffes (Witzgall,1964) und damit auch die Wirksamkeit der Antibiotika und Chemotherapeutika beeinflusst (Dettli,1964). Beispielsweise ist nur der nicht an Protein gebundene Anteil eines Stoffes für metabolisierende Enzyme der Leber zugänglich.
Ebenso kann die renale Elimination eines Stoffes durch die Proteinbindung verzögert werden (Rieder, 1973).
Da die Proteinmoleküle normalerweise nur in begrenztem Umfang durch die Kapillarwände des Blutgefäßsystems diffundieren können, werden proteingebundene Moleküle u.U. im Blut festgehalten.
Im Verteilungsgleichgewicht ist die Konzentration des freien Anteils eines Stoffes im Gewebs- und Zellwasser in allen Teilräumen des Organismus, in die der Stoff eindringen kann, gleich der Konzentration im Plasmawasser (Dost,1968). Infolgedessen kann die Wirkung eines Stoffes mit hoher Proteinbindung verzögert bzw. die Wirksamkeit verringert werden.
Eine ausführliche Darstellung der Bedeutung der Proteinbindung für die pharmakologischen Eigenschaften von Arzneimitteln findet sich bei Rieder (1973).
Nach Klotz (1946) kann das konzentrationsabhängige Gleichgewicht zwischen einem adsorbierten Stoff und dem adsorbierenden Protein nach Art einer reversiblen chemischen Bindung durch die Langmuir'sche Adsorptionsisotherme quantitativ vollständig beschrieben werden.

Die Art der Bindung ist noch nicht vollständig verstanden (Scholtan, 1968). Im wesentlichen kommen drei Bindungstypen in Frage, nämlich die Ionenbindung, die hydrophobe Bindung und Wasserstoffbrückenbindungen (Kriéglstein,1973).
Im vorliegenden Fall der polychlorierten Biphenyle, die keine Ionen bilden können und weitgehend unpolar sind, kann die Proteinbindung in Analogie zu anderen Kohlenwasserstoffen mit aromatischem Grundgerüst (Sahyun,1964) als hydrophobe Bindung gedeutet werden.
Diese Wechselbeziehung wird von Némethy und Scheraga (1962) folgendermaßen erklärt:
Im Wasser sind nach Frank u.Evans (1946) Schwärme von Wassermolekülen vorhanden, die durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden und eisartige Strukturen bilden. Diese Schwärme stehen im Gleichgewicht mit freien Wassermolekülen. Die Auflösung eines unpolaren Stoffes in Wasser bewirkt aus energetischen Gründen eine zunehmende Ordnung der Wassermoleküle in der Umgebung des unpolaren Moleküls. Dies führt zu einer Verringerung der Unordnung in der Lösung; die Reaktionsentropie des Vorgangs wird stark negativ.
Die Ausbildung einer unpolaren "hydrophoben" Bindung zwischen zwei unpolaren Gruppen verringert die Zahl der Wassermoleküle, die mit diesen Gruppen in Wechselwirkung stehen. Damit geht eine Änderung der Struktur des Wassers in Richtung einer Vergrößerung der Unordnung in der Lösung und damit einer großen Entropiezunahme einher. Diese Entropieänderung ist die treibende Kraft für die Ausbildung einer hydrophoben Bindung zwischen zwei unpolaren Gruppen. Daneben werden für die Ausbildung einer Bindung van der Waal'sche Kräfte in Betracht gezogen (Scholtan,1964).
Die meisten Fremdstoffe werden an Albumin gebunden, das sowohl mengenmäßig als auch hinsichtlich der Bindungseigenschaften in Bezug auf Kapazität und Vielfalt der gebundenen Stoffe alle anderen Serumproteine übertrifft (Dost,1968).
Die Albuminbindung stand bei der vorliegenden Arbeit im Vordergrund; daneben wurden vergleichende Untersuchungen mit Rinderplasma sowie Serumglobulinen durchgeführt.

1.1. Bestimmung der Proteinbindung

Verschiedene Verfahren, wie Ultrafiltration, Ultrazentrifugation (Büttner, 1961), Gleichgewichtsdialyse (Davies,1942) sowie Gelfiltrationstechniken (Nichol & Winzor,1964, Hummel & Dreyer, 1962) unter Verwendung von Dextrangelen, wurden beschrieben.

Das Prinzip sämtlicher Methoden beruht auf der Gewinnung einer eiweißfreien Lösung, die den untersuchten Stoff in der Konzentration des freien Anteils enthält. Der gebundene Anteil entspricht der Differenz zwischen der Gesamtkonzentration in der Proteinlösung und der Konzentration des freien Anteils.

1.2. Gleichgewichtsdialyse

Dieses Verfahren zeichnet sich durch geringe Störung des Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenem Anteil und hohe Reproduzierbarkeit (Kurz,1970, Rieder,1973) aus, wobei allerdings die Adsorption des untersuchten Stoffes an die Dialysemembran berüchsichtigt werden muß.
Für die Untersuchung der PCB's war ursprünglich die Gleichgewichtsdialyse vorgesehen.
Gebräuchlicherweise wird die untersuchte Substanz der Proteinlösung zugesetzt und diese gegen Puffer dialysiert. Nach Einstellung des Gleichgewichts entspricht die Konzentration der Substanz in der eiweißfreien Lösung der freien Konzentration in der Proteinlösung, da nur die nicht an Protein gebundenen Moleküle durch die Poren des Dialyseschlauchs diffundieren können. Die Konzentration in der eiweißfreien Lösung wird gemessen .
Im vorliegenden Fall war eine exakte Bestimmung der PCB-Konzentration in der eiweißfreien Lösung nicht möglich, da diese durch die geringe Wasserlöslichkeit begrenzt und damit sehr niedrig ist. In diesem Fall tritt die Wandadsorption sehr stark in Erscheinung, da wässrige PCB-Lösungen sehr unbeständig sind und zur Entmischung neigen.
Durch die Verwendung einer Suspension der PCB's in der eiweißfreien Lösung blieb während der Versuchsdauer eine gesättigte wässrige Lösung erhalten, wie Kontrollversuche zeigten. Die Wandadsorption konnte in diesem Fall unberücksichtigt bleiben. Die direkte Bestimmung des freien Anteils war allerdings nicht möglich.
Der freie Anteil in der Eiweißlösung ist in diesem Fall gleich der Löslichkeit in Wasser, die gesondert bestimmt wurde. Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar. Nachteilig erschien die langsame Einstellung des Gleichgewichts infolge der geringen Löslichkeit, die eine relativ lange Versuchsdauer von 48 ÷ 72 Stunden bedingte. Gleichzeitig war es bei besonders schwerlöslichen Verbindungen, wie DDT, fraglich, ob das Bindungsgleichgewicht tatsächlich erreicht oder die Gleichgewichtseinstellung durch eine sehr langsame Konzentrationsänderung nur vorgetäusch wurde.

Bei höheren Proteinkonzentrationen (5 - 10 mg/ml) reichte die Versuchsdauer für eine Gleichgewichtseinstellung nicht aus. Beispielsweise wurden bei einer Konzentration von 10 mg Albumin/ml nur 1.43 µg 2,2'-DCB/mg Albumin gebunden, während bei einer Albuminkonzentration von 1 mg/ml 3.49 µg/mg gebunden wurden (s.Tab.2a).

1.3. Bestimmung der Löslichkeit

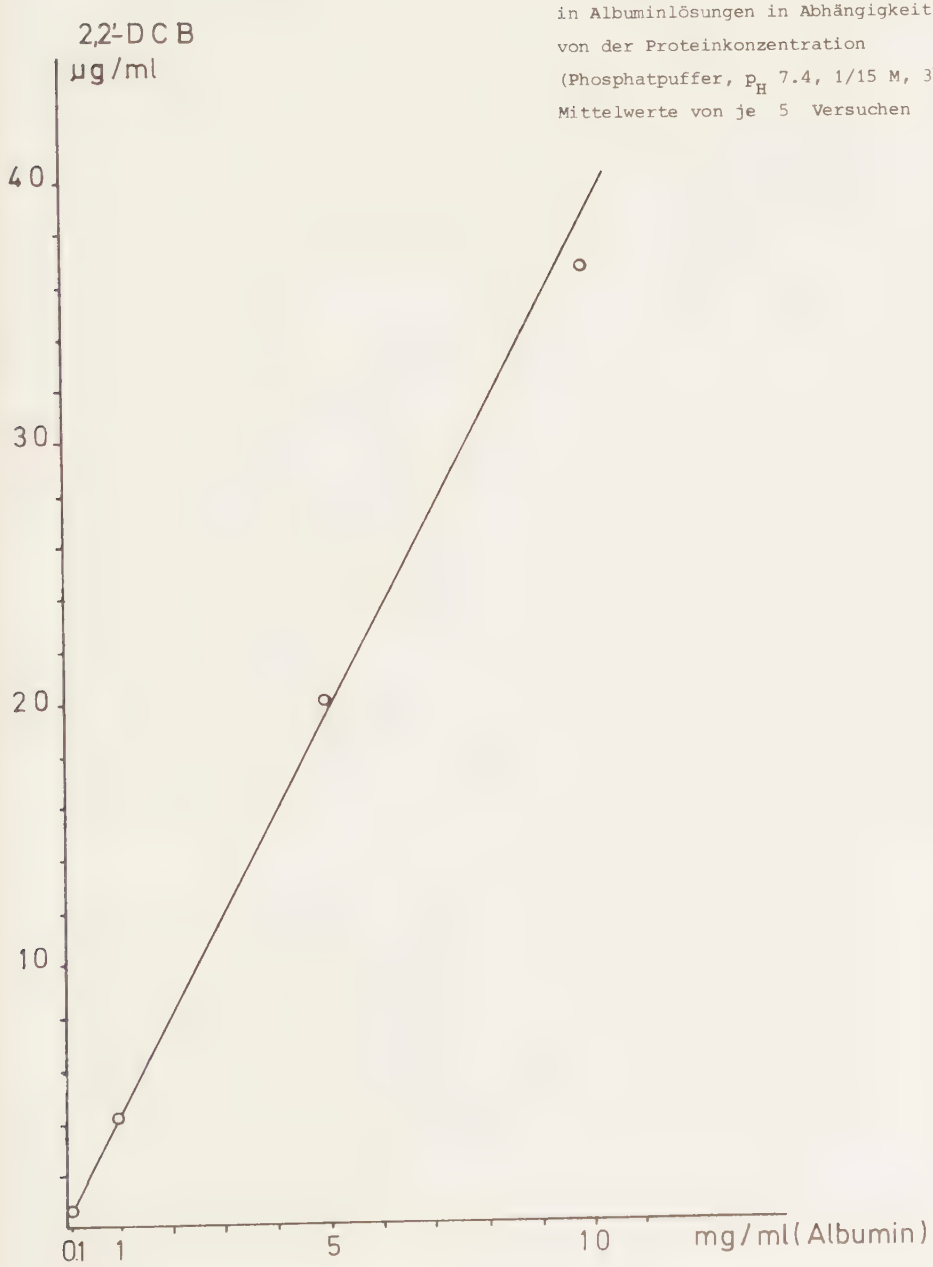
Schon früher war eine Erhöhung der Löslichkeit von Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden in Serum gegenüber Wasser beobachtet worden (Weikel, 1958). Als Ursache für diese Erscheinung wurde die Bindung an Serumproteine angenommen.
Die Bestimmung der Löslichkeit in Proteinlösungen wurde z.B. von Sahyun (1964,1966) für die Untersuchung der Proteinbindung schwerlöslicher aromatischer Kohlenwasserstoffverbindungen herangezogen.
Im vorliegenden Fall traten bei niedrigen Proteinkonzentrationen (1 - 2 mg/ml) gegenüber der Gleichgewichtsdialyse keine signifikanten Abweichungen ($P > 0.1$) auf.
Die Dialyse bot keinen erkennbaren Vorteil in Bezug auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Wegen der kürzeren Versuchsdauer und damit verringerten Gefahr einer Denaturierung der Proteine ist die Bestimmung der Löslichkeit vorzuziehen.
Die Löslichkeit von 2,2'-DCB in Albuminlösungen nimmt in einem Konzentrationsbereich von 0.1 - 10 mg Albumin/ml proportional zur Proteinkonzentration zu (Abb.14).
Der gebundene Anteil in Albuminlösungen beträgt bei allen untersuchten Verbindungen mit Ausnahme von Lindan über 90% der Gesamtkonzentration.

1.4. Gelfiltration

Zwei Gelfiltrationstechniken wurden unter Verwendung verschiedener Gele für die Untersuchung der Albuminbindung von PCB's erprobt. Die gaschromatographische Bestimmung der PCB-Konzentration in den proteinfreien Fraktionen erwies sich wegen der niedrigen Konzentrationen als schwierig, wodurch die Verwendbarkeit der Verfahren eingeschränkt wird. Für die Untersuchung höherchlorierter Biphenyle ist die Methode wegen der hohen irreversiblen Adsorption an das Gel nicht geeignet.
Bei der Bestimmung der Bindung von 2,2'-DCB wurde übereinstimmend mit den anderen Verfahren ein gebundener Anteil von 91.2% - 98.4% (Gleichgewichtsdialyse u. Löslichkeit: 90.7% - 86.1%) gefunden.

Abb. 14

Löslichkeit von 2,2'-Dichlorbiphenyl in Albuminlösungen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Phosphatpuffer, p_H 7.4, 1/15 M, 3°C) Mittelwerte von je 5 Versuchen



1.5. Albuminbindung von polychlorierten Biphenylen

Die Anzahl der gebundenen Moleküle je Albuminmolekül variiert bei den untersuchten Substanzen bei einer Temperatur von 3°C zwischen 0.033 (DDT) und 1.08 (2,2'-DCB). Die gebundene Menge nimmt mit der Löslichkeit in Wasser zu. Für den Zusammenhang der Löslichkeit, ausgedrückt als log x (mM/l) und der Zahl der gebundenen Moleküle,als log K (M/M) wurde ein Korrelationskoeffizient r = + 0.95 berechnet. Die zugehörige Regressionsgerade hat die Gleichung log y = 0.7 log x - 0.27.
Eine Zunahme der Zahl der gebundenen Moleküle mit der Löslichkeit wurde bereits früher bei verschiedenen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen beobachtet (Sahyun,1966).
In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen war bei 22°C gegenüber 3°C ein Anstieg der Zahl der gebundenen Moleküle (0.16 gegenüber 0.07 bei Dieldrin; 2.05 gegenüber 1.08 bei 2,2'-DCB) festzustellen. Das Verhältnis von freiem zu gebundenem Anteil blieb demgegenüber praktisch unverändert (Tab.2a,b). Dieser Anstieg der Zahl der gebundenen Moleküle bei erhöhter Temperatur ist vermutlich auf die gleichzeitig erhöhte Wasserlöslichkeit der PCB's zurückzuführen, die gleichbedeutend mit einer Erhöhung des freien Anteils in der Lösung ist. Da der freie und gebundene Anteil entsprechend dem Massenwirkungsgesetz im Gleichgewicht stehen, steigt bei einer Erhöhung des freien Anteils auch der gebundene Anteil in der Lösung.
Der Vergleich der vorliegenden Daten mit den Werten die von Sahyun (1966) für aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen angegeben wurden (Tab.2c) zeigt, daß die Werte für die Anzahl der gebundenen Moleküle je Albuminmolekül in der gleichen Größenordnung liegen, während die Löslichkeit der Chlorkohlenwasserstoffverbindungen in Phosphatpuffer niedriger ist.

1.6. Globulinbindung von 2,2'-Dichlorbiphenyl

Die Annahme, daß für den Transport von PCB's im Plasma das Albumin, daneben aber auch Plasmaglobuline verantwortlich sind, konnte durch eine vergleichende Untersuchung weitgehend bestätigt werden.
Der Vergleich der Bindung von 2,2'-DCB an Albumin, α-Globulin, β-Globulin und γ-Globulin zeigte, daß sowohl Albumin als auch Globuline PCB's binden können. Die Bindungskapazität von α- und β-Globulin beträgt 80% bzw. 57.8% der Kapazität von Albumin, die von γ-Globulin dagegen nur 0.17% (Tab. 6a).

Tab. 2 c

Vergleich von Bindungsdaten für aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen (ber.n.Sahyun,1966), polychlorierte Biphenyle und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide

10 mg/ml Albumin, Phosphatpuffer, 0.1 M, p_H 7.5, 25°C (Sahyun,1966) (Bestimmung der Löslichkeit)		
	Anzahl der geb. Moleküle/ Molekül Albumin	Löslichkeit in Puffer (Mol/l)
p-Aminobiphenyl	8.51	6.3×10^{-4}
Naphthalin	2.39	1.5×10^{-4}
Biphenyl	1.78	2.5×10^{-5}
p-Brombiphenyl	0.55	3.2×10^{-6}
p-Phenylacetophenon	0.48	1.2×10^{-5}
Anthracen	0.14	6×10^{-7}
1 mg/ml Albumin, Phosphatpuffer, 0.15 M, p_H 7.4, 22°C (eigene Unters.) (Bestimmung der Löslichkeit)		
4 - Chlorbiphenyl	1.91 ± 0.36	2.2×10^{-6}
2,2'-Dichlorbiphenyl	2.05 ± 0.11	2.6×10^{-6}
2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl	1.54 ± 0.15	1.2×10^{-6}
Dieldrin	0.16 ± 0.02	2.6×10^{-7}
DDT	0.31 ± 0.1	3×10^{-9}

Ausgehend von elektrophoretisch ermittelten Werten für die Zusammensetzung des verwendeten Rinderplasmas ergibt sich für Albumin ein Anteil von 82%, für die α-Globulinfraktion von 10.4% und für die β-Globuline von 7.4 % der gesamten Bindungskapazität von Rinderplasma. Obwohl die γ-Globulinfraktion 29 % des Gesamteiweißgehalts ausmacht, beträgt ihr Anteil an der Bindungskapazität nur 0.07 % (s. Tab. 6b,7).
Aus den für die einzelnen Proteinfraktionen bestimmten Werten kann die Bindungskapazität von Rinderplasma für 2,2'-Dichlorbiphenyl berechnet werden, wobei sich ein theoretischer Wert von 167 µg/ml Plasma bzw.

2.25 µg/mg Protein ergibt. Dieser Wert stimmt mit dem experimentell bestimmten Wert von 187.3 ± 12.5 µg/ml bzw. 2.55 ± 0.17 µg/mg gut überein.

1.7. Elektrophorese

Da nicht ohne weiteres angenommen werden kann, daß die Verteilung im Plasma, insbesondere bei niedrigeren PCB-Konzentrationen mit der aufgrund der Bindungsdaten für einzelne Plasmaproteinfraktionen berechneten Verteilung übereinstimmt, wurde der Versuch gemacht, die Verteilung im Plasma direkt zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde PCB-haltiges Plasma und Serum von Rindern und Ratten elektrophoretisch in 4 -5 Proteinfraktionen getrennt. Dabei wurde im Gegensatz zu den Angaben von Moss und Hathway (1964) trotz übereinstimmender Versuchsbedingungen ein negatives Ergebnis erhalten.
Für diese Versuche wurden ^{14}C-2,2'-Dichlorbiphenyl und ^{14}C- Dieldrin verwendet. Der Nachweis der Substanzen erfolgte durch Dünnschicht-Scanning bzw. Kontaktautoradiographie mit anschließender photometrischer Auswertung.
2,2'-Dichlorbiphenyl und Dieldrin waren in jedem Fall nur an der Auftragstelle auf der als Träger verwendeten Celluloseacetatfolie, nicht aber im Bereich der Proteinfraktionen nachweisbar.
Das Ergebnis der Elektrophorese deutet darauf hin, daß die Adsorption an die Celluloseacetatfolien erheblich stärker ist, als die Bindung an die Serumproteine. Als Hinweis auf eine starke Adsorption ist auch die gegenüber Serum erheblich verringerte Extrahierbarkeit von PCB's in Gegenwart von Celluloseacetat-Homogenaten zu werten.
Die Angaben von Moss und Hathway (1964), wonach Dieldrin in der Albumin- und α-Globulinfraktion im elektrischen Feld transportiert wird, konnten somit nicht bestätigt werden.
Als Ursache für diese widersprechenden Ergebnisse wird angenommen, daß die als Trägermaterial verwendeten Celluloseacetatfolien (Cellogel,Serva) möglicherweise hinsichtlich ihrer Adsorptionseigenschaften von den von Moss und Hathway verwendeten Folien abweichen. Leider werden von den

genannten Autoren keine Angaben darüber gemacht, welcher Anteil der eingesetzten Menge in den Proteinfraktionen gefunden wurde, bzw. ob und wieviel am Startpunkt zurückblieb.

1.8. Bindung an Rinderplasma

Die Untersuchung der Bindung an Rinderplasma ergab für die einzelnen Substanzen mit der Albuminbindung vergleichbare Werte (Tab.6b). Der gebundene Anteil im Plasma betrug bei allen untersuchten Verbindungen über 99% der Gesamtmenge. Dieser Befund steht in Überinstimmung mit den Ergebnissen von Ferry et al. (1972) die für DDT, Dieldrin und Lindan in Schafserum einen gebundenen Anteil von 99.97 %, 99.9 % und 98.7% bestimmten, wobei die Konzentration des freien Anteils, die mit Hilfe von Ultrafiltration ermittelt wurde, der Löslichkeit in Wasser entsprach.
Garretson u. Curley (1969) geben für die Bindung von Dieldrin an Humanserum einen gebundenen Anteil von 99.8 % (Bestimmung durch Gleichgewichtsdialyse) gegenüber 99.9 % im vorliegenden Fall, an.

1.9. Konkurrenz und Verdrängung aus der Proteinbindung

Ein Problem, das in Zusammenhang mit der Proteinbindung diskutiert wurde (Schoor,1973) ist die Verdrängung von Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden aus der Bindung durch andere Substanzen, wie Pharmaka oder sonstige lipophile Verbindungen, z.B. polychlorierte Biphenyle und die daraus resultierende Möglichkeit einer akuten Vergiftung.
Die Frage der Konkurrenz um die Bindungsstellen am Proteinmolekül wurde durch Bestimmung der Löslichkeit von zwei Substanzen nebeneinander untersucht. Dabei wurde in einigen Fällen eine signifikante Abnahme der gebundenen Menge beobachtet (Tab.4). Die gebundene Menge von 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl war in Gegenwart von Dieldrin sogar leicht erhöht. Nach Franz et al. (1969) kann neben einer Verdrängung aus der Proteinbindung, wenn zwei Pharmaka Affinitäten zu den gleichen Bindungsstellen am Albuminmolekül besitzen, auch eine Zunahme der Bindung erfolgen, da gebundene Pharmaka die Tertiärstruktur des Albumins beeinflussen können.

Dabei kann es zu einer Schwellung und Auffaltung des Albuminmoleküls kommen, wodurch weitere Bindungsstellen an die Oberfläche gelangen. Daneben ist in Betracht zu ziehen, daß sich die Affinität einer Bindungsstelle in der Nachbarschaft eines gebundenen Arzneimittelmoleküls ändern kann. Dies könnte zu einer Abnahme oder Zunahme des Bindungsvermögens führen. Ein Verdrängungseffekt kann durch das gleichzeitig zunehmende Bindungsvermögen der Albuminlösung maskiert sein (n. Franz,1969).
Aus den genannten Gründen erscheint es nicht ohne weiteres möglich, aus den vorliegenden Daten Rückschlüsse auf die unterschiedliche Bindungsaffinität von Albumin für die untersuchten Substanzen zu ziehen.
Lässt man die letztgenannte Möglichkeit einer "Maskierung" der Verdrängung durch gleichzeitige Zunahme des Bindungsvermögens von Albumin unberücksichtigt, so könnte man die folgenden Feststelllungen treffen:
2,2'-Dichlorbiphenyl konkurriert mit Lindan um die gleichen Bindungsstellen, da beide Substanzen bei gleichzeitigem Vorhandensein in geringerem Ausmaß gebunden werden als dann, wenn nur eine Substanz anwesend ist.
Die Bindung von 2,2'-DCB wird durch 2,5,2'5'-TCB nicht beeinflusst, jedoch wird 2,5,2'5'-TCB in Gegenwart von 2,2'-DCB in geringerem Umfang gebunden. Dies könnte bedeuten, daß 2,2'-DCB an die gleichen Bindungsstellen mit höherer Affinität gebunden wird, als 2,5,2'5'-TCB. Dagegen spricht, daß die Bindung von 2,2'-DCB durch Dieldrin verringert, die Bindung von 2,5,2'5'-TCB jedoch geringfügig erhöht wird.Die Bindung von Dieldrin wird dagegen weder durch 2,2'-DCB noch durch 2,5,2'5'-TCB beeinflusst.
Als Erklärung für diese Erscheinung könnte die Annahme von verschiedenen Bindungsstellen für 2,2'-Dichlorbiphenyl, 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl und Dieldrin herangezogen werden, wobei die Bindung von Dieldrin die Tertiärstruktur des Albumins in der Weise verändert, daß die Affinität für 2,2'-DCB verringert, bzw. die Affinität für 2,5,2'5'-TCB geringfügig erhöht wird. Dementsprechend würde die Affinität von Albumin für 2,5,2'5'-TCB durch 2,2'-DCB verringert werden, während 2,5,2'5'-TCB keinen derartigen Einfluß auszuüben vermag.
Es muß jedoch ausdrücklich betont werden, daß dieser Deutungsversuch nur eine Möglichkeit darstellt, die beobachteten Phänomene zu erklären.
Zur weiteren Klärung der angeschnittenen Fragen erscheinen eingehende

Untersuchungen erforderlich, die außerhalb der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit liegen.
Obwohl grundsätzlich die Möglichkeit einer kompetitiven Verdrängung aus der Bindung besteht, erscheint die Gefahr einer akuten Vergiftung durch Freisetzung der im Plasma gebundenen Insektizide und PCB's sehr gering, da die unter natürlichen Bedingungen auftretenden Konzentrationen die maximale Bindungskapazität des Plasmas, ausgenommen bei akuten Intoxikationen, mit Sicherheit nicht erreichen.
Die bei epidemiologischen Untersuchungen im Blut gefundenen Konzentrationen liegen selbst bei Personen, die beruflich über einen längeren Zeitraum in direkten Kontakt mit Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden kamen, im ppb (µg Insektizid/l Blut)-Bereich (Dale,1966, Radomski,1971).
Die im Blut eines Erwachsenen von 70 kg Körpergewicht enthaltene Menge beträgt bei einer Pestizid-Konzentration von ca. 0. 54 mg/l (berechnet n. Radomski, 1971) , wie sie bei Pestizidarbeitern beobachtet wurde, bei einem Blutvolümen von ca. 5 - 6 Liter insgesamt nur 2 - 3 mg.Umgerechnet auf das Körpergewicht würde die Belastung bei spontaner Freisetzung der gesamten im Blut enthaltenen Menge mit nachfolgendem Übertritt in die Gewebe nur 0.04 mg/kg Körpergewicht betragen und somit weit unterhalb einer toxikologisch relevanten Dosis (Wegler, 1970, Jager,1970) liegen.
Gleiche Überlegungen gelten analog für die polychlorierten Biphenyle.

2. Vergleich mit früheren Untersuchungen

Für PCB's sind in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen vorhanden. Die Bedeutung der Proteinbindung für den Transport von Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden im Blut wurde hingegen mehrfach betont (Weikel, 1958,Mick,1971,Schoor,1973). Es gibt jedoch relativ wenig qualitative und quantitative Untersuchungen, die überdies nur teilweise einer kritischen Würdigung standhalten.
Ferry et al. (1972) stellten fest, daß im Serum von Schafen drei Serumproteinfraktionen, die durch Trennung an Sephadex-Gel (G 200,superfine) erhalten wurden, am Transport beteiligt sind, wobei die höchsten Konzentrationen von DDT in der ersten, Dieldrin in der zweiten und dritten und Lindan in der dritten Proteinfraktion, in Reihenfolge der Elution gefunden wurden. Leider werden keine Angaben über die Zusammensetzung bzw. Einheitlichkeit der Proteinfraktionen gemacht.

Vergleichende Untersuchungen von Human- und Rattenserum brachten abweichende Ergebnisse. Quantitative Angaben über diese Abweichungen fehlen jedoch.

In Humanserum (Morgan,1972) war der überwiegende Anteil von p,p'-DDT und p,p'-DDE mit Albumin, daneben in geringem Umfang mit α- und β- Globulinen assoziiert. Dieser Befund stimmt mit den vorliegenden Ergebnissen (s.Tab.6a) überein.

Daneben wurden diese Substanzen in Lipoproteinfraktionen, die durch Ultrazentrifugation erhalten worden waren, gefunden, hauptsächlich in den triglyzeridreichen low-density (49 - 56% der Gesamtmenge an p,p'-DDT) und very-low-densitiy-Fraktionen.

In der Zellfraktion des Blutes wurden 7 - 18 % ($\bar{x}$ = 12.5%) der Gesamtmenge an DDT im Blut, dagegen 17 - 48 % der Gesamtmenge an Dieldrin gefunden. Diese Werte, die an Blutproben von Pestizidarbeitern ermittelt wurden stimmen mit den in vitro an Rinderblut erhaltenen Daten (10.4% p,p'-DDT, bzw. 14.5% Dieldrin in der Zellfraktion) relativ gut überein (s.Tab.8).

Jakubowski (1973) nimmt aufgrund einer Untersuchung der Bindung von Dieldrin an Albumin-Globulin-Mischungen mit einem Albumingehalt von 59 bzw. 95% an, daß die Bindung vorwiegend an Albumin erfolgt.

Die gebundene Menge betrug 0.19 - 0.22 µg Dieldrin/mg Protein (Dialyse, 22°C). Zwischen den beiden Mischungen wurde kein signifikanter Unterschied gefunden.

Weikel (1958) gibt für die Bindung von DDT an Kaninchenserum einen Wert von 6.3 - 8.5 µg/mg Protein an. Allerdings ist nicht ersichtlich, wie dieser Wert ermittelt wurde, da das DDT in Aceton gelöst zu dem Serum zugesetzt wurde und nähere Angaben über die Bestimmung der Proteinbindung fehlen.

Der Vergleich mit der vorliegenden gaschromatographischen Bestimmung, die für Albumin einen Wert von 1.58 $\pm$ 0.53 µg/mg Protein ergab, ist allerdings nicht ohne weiteres möglich, da die quantitative Bestimmung im Biotest durch Prüfung der Toxizität gegenüber Stubenfliegen ausgeführt wurde.

Die Bindung von p,p'-DDE an Humanserum in vivo wurde nach Trennung der Proteinfraktionen durch Gelchromatographie untersucht (Schoor,1973).

Mit Ausnahme der Feststellung, daß in der γ-Globulinfraktion "sehr wenig" p,p'-DDE gefunden wurde, werden keine Angaben über die Verteilung gemacht.

Die Verteilung von Dieldrin und Telodrin im Blut wurde eingehend untersucht (Moss u. Hathway,1964). Die Löslichkeit von Dieldrin in Kaninchenserum betrug 144 - 210 µg/ml (20°C) gegenüber 40.5 $\pm$ 4.3 µg/ml im vorliegenden Fall (Rinderplasma, 3°C, s. Tab.6b).

In Plasma und Erythrozyten von Ratten wurden 74.8 bzw. 23.6% der Gesamtmenge im Blut gefunden. Die Leukozytenfraktion enthielt nur 1.4% der Gesamtmenge. In Kaninchenserum und -erythrozyten wurden 66.5% bzw. 28% der Gesamtmenge an Dieldrin gefunden. Die Erythrozytenmembranen enthielten nur 3.6%.

Diese Werte sind mit den im vorliegenden Fall an Rinderblut und -plasma gefundenen Werten (82.5% Dieldrin im Plasma, 14.5% in Erythrozyten, s. Tab.8) vergleichbar, wobei artspezifische Unterschiede im Proteingehalt und der Zusammensetzung der Plasmaproteine zu berücksichtigen sind. Unterschiede in der Proteinbindung von Arzneimitteln an Plasma von verschiedenen Säugetierarten wurden bereits früher beschrieben (Kurz u. Friemel,1967).

3. Verteilung von PCB's im Blut

3.1. Verteilung zwischen Blutzellen und Plasma

Die zellulären Bestandteile des Blutes sind ebenfalls am Transport von PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden beteiligt. Die Konzentration in Leukozyten und Thrombozyten reichte für eine gaschromatographische Bestimmung nicht aus, wie Vorversuche zeigten. Daher wurde die gesamte Zellfraktion (Erythrozyten + Leukozyten) untersucht.

Die Gleichgewichtseinstellung zwischen PCB's im Plasma und in der Zellfraktion erfolgt in vitro bei 37°C innerhalb von 2 - 3 Minuten. Der Anteil im Plasma betrug zwischen 55.8 und 94.5 % der Gesamtmenge, bei 60 Vol.% Plasma im Blut. Die niedrigste Plasmakonzentration wurde bei 2,2'-Dichlorbiphenyl gefunden, die höchsten bei den beiden Hexachlorbiphenylisomeren (Tab.8, Abb.7).

Mit Ausnahme von 2,2'-Dichlorbiphenyl unterscheiden sich die prozentualen Anteile der Gesamtmenge im Plasma für die einzelnen Substanzen nicht signifikant ($P > 0.1$).

Der überwiegende Anteil (60 - 95 %, bezogen auf Zellen) der PCB's in der Zellfraktion wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Moss u. Hathway (1964) im Zellinhalt gefunden. Die Bindung an Membranproteine scheint demnach eine geringe Rolle für die Bindungskapazität von Erythrozyten für PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide zu spielen.

3.2. Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung

Die Abhängigkeit der Verteilung zwischen Plasma und Blutzellen von der Gesamtkonzentration im Blut wurde für 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl untersucht. Dabei wurde eine Abnahme der relativen Konzentration im Plasma bei höheren Gesamtkonzentrationen beobachtet.

Eine Zunahme der relativen Konzentration in den Blutzellen war nicht feststellbar. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Konzentration und Verteilung konnte nicht ermittelt werden.

Mick (1971) fand für die Verteilung von Dieldrin in Humanblut in vivo ebenfalls keine Abhängigkeit der Konzentration in der Zellfraktion von der Konzentration im Plasma. Die Verteilung scheint demnach, insbesondere im unteren Konzentrationsbereich, unabhängig von der Gesamtkonzentration zu sein.

3.3. Proteinbindung und Verteilung im Blut

Ausgehend von der Annahme, daß nur die nicht an Protein gebundenen Moleküle durch die Erythrozytenmembran diffundieren können, ist die Einstellung eines komplexen Gleichgewichts zwischen freiem und proteingebundenem Anteil im Plasma einerseits und freiem Anteil und Erythrozyten andererseits zu erwarten.

Der Zusammenhang zwischen Proteinbindung und Verteilung im Blut wurde durch Veränderung der Proteinkonzentration im Plasma untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Verteilung im normalen Bereich zwischen 60 - 80 mg Protein/ml Plasma weitgehend konstant bleibt. Erst bei niedrigen Proteinkonzentrationen und demzufolge stark verringerter Bindungskapazität des "Plasmas" ändert sich die Verteilung zugunsten der Blutzellen (Abb.8). Im unteren Bereich der Proteinkonzentration ist zwischen der Verteilung von 2,2'-DCB und 2,5,2'5'-TCB praktisch kein Unterschied mehr festzustellen. Daraus kann geschlossen werden, daß das Verteilungsmuster weitgehend durch die Proteinbindung bestimmt wird.

Bei einer Freisetzung der im Plasma gebundenen PCB's durch kompetitive Verdrängung, wie sie bereits im Zusammenhang mit der Proteinbindung diskutiert wurde, ist aufgrund der Ergebnisse mit modifiziertem Plasma und entsprechend verringerter Bindungskapazität allenfalls eine Änderung des Verteilungsmusters zu erwarten.

Darüberhinaus konnte die Annahme, daß die Erythrozytenmembran für Chlorkohlenwasserstoffverbindungen relativ durchlässig ist (Moss u. Hathway, 1964) bestätigt werden.

4.1. Lipophilie von PCB's

Die Lipophilie bzw, der hydrophobe Charakter von Pharmaka wird allgemein durch den Verteilungskoeffizienten zwischen einem organischen Lösungsmittel und Wasser charakterisiert (Krigelstein,1973) wobei der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient die Lipophilie von Arzneimitteln in befriedigender Weise beschreibt.
Folgende Faktoren werden in hohem Maß von der Lipophilie einer Substanz beeinflusst (Krieglstein,1973):

1. die Permeation durch Membranen
2. die Affinität zu den makromolekularen Strukturen der Gewebe
3. die Affinität zu den Plasmaproteinen
4. die Löslichkeit in Gewebslipiden

Die Octanol/Wasser- Verteilungskoeffizienten der PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide liegen im Bereich zwischen 2 und 40 x 10^4, für das Sytem Hexan/Wasser wurden Verteilungskoeffizienten von 2 - 10 x 10^3 gemessen (Voerman,1969). Die für Pharmaka beschriebenen Unterschiede liegen dagegen für das System n-Heptan/Puffer im Bereich zwischen 10^{-3} und 10^{-1} für hydrophile bzw. lipophile Stoffe (Raaflaub,1970).
Für pharmakokinetische Zwecke können demnach PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide einheitlich als extrem lipophile bzw. hydrophobe Stoffgruppe betrachtet werden.

4.2. Elimination aus dem Blut

Die Bedeutung der Lipophilie bzw. der davon abhängigen Parameter der Verteilung wurden am Beispiel der isoliert perfundierten Leber untersucht. Die Perfusion wurde mit einem zellfreien Perfusionsmedium mit einem gegenüber Plasma verringerten Proteingehalt von 35 - 40 mg/ml durchgeführt.
Der Zusatz von Blutzellen zum Perfusionsmedium wurde vermieden, da der Einfluß der Proteinbindung auf die Aufnahme der untersuchten Substanzen unabhängig von der Erythrozytenbindung untersucht werden sollte. Die Sauerstoffversorgung der Leber ist unter diesen Bedingungen allerdings nicht in vollem Umfang gewährleistet (Kessler,1967), jedoch scheint die Aufnahme von lipophilen Substanzen in die Leber unabhängig von

energieliefernden Prozessen vorwiegend aufgrund der hohen Affinität zu dem Lebergewebe zu erfolgen, wie am Beispiel des Promazins (Krieglstein,1969) bei Versuchen ohne Sauerstoffzufuhr und unter Zusatz von Kaliumcyanid zum Perfusionsmedium gezeigt wurde.
Bei der Untersuchung der Aufnahme von 2,2'-Dichlorbiphenyl, 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl, Lindan und Dieldrin wurden zwischen den einzelnen Substanzen keine signifikanten Unterschiede ($P > 0.05$) gefunden. Die Elimination aus dem Blutplasma bzw. die Aufnahme in die Leber erfolgt demnach praktisch unabhängig von den Unterschieden in der Lipophilie, ausgedrückt durch den Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten.
Jähnchen et al. (1970) konnten bei der Untersuchung der Aufnahme von Chlorpromazin und Promazin in die isoliert perfundierte Rattenleber zeigen, daß das Chlorpromazin, das lipophiler ist als das Promazin, aber auch eine stärkere Proteinbindung aufweist, schneller in die Leber aufgenommen wird als das Promazin.
Daraus wurde geschlossen daß sowohl die Lipophilie als auch die Albuminbindung von Phenothiazinderivaten für die Aufnahme in die perfundierte Leber von Bedeutung sind, wobei in der initialen Phase der Aufnahme der hydrophobe Charakter dieser Pharmaka die ausschlaggebende Rolle zu spielen scheint. (zit.n.Jähnchen et al.,1970).
Die Aufnahme von Promazin in die Leber wird von der Albuminkonzentration im Perfusat beeinflusst (Krieglstein,1969) wobei die Aufnahme mit der Konzentration an freiem Promazin im Perfusionsmedium zunimmt. Die Ergebnisse wurden mit einem dynamischen Gleichgewicht zwischen dem an Albumin und dem im Gewebe gebundenen Arzneimittel erklärt.
Kurz (1961) fand bei Untersuchungen an der isoliert perfundierten Kaninchenleber, daß Verbindungen mit hohem Öl/Wasser-Verteilungskoeffizienten im Gegensatz zu solchen mit einem niedrigen Verteilungskoeffizienten sehr rasch aus der Perfusionslösung eliminiert wurden. In Verbindung mit weiteren Versuchen an Gewebsschnitten wurde auf das Vorhandensein einer Lipoidbarriere zwischen Blut und Lebergewebe, ähnlich der Blut-Hirnschranke geschlossen, die vermutlich in der Blutgefäßwand oder in unmittelbarer Nähe derselben zu suchen ist.
Die Diffusion von Stoffen aus dem Plasma in Gewebe wird durch Zellmebranen und die Bindung an Plasmaproteine gehemmt (Jähnchen,1971).

Die Penetration durch eine Lipoidmembran erfolgt um so schneller, je größer der Verteilungskoeffizient eines Stoffes ist.
Nach Krieglstein (1973) ist für lipophile Pharmaka kein wesentlicher Einfluß der Plasmaproteinbindung auf das Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und Geweben zu erwarten.
Die vorliegenden Versuchsergebnisse bezüglich der Aufnahme von PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden in die isoliert perfundierte Rattenleber stehen in Übereinstimmung mit den erwähnten Befunden für lipophile Pharmaka. Demnach dürfte in erster Linie der extrem hohe Verteilungskoeffizient, der für das System Octanol/Wasser bestimmt wurde, maßgeblich sein, während demgegenüber die Unterschiede in der Proteinbindung vermutlich nur geringen Einfluß auf die Aufnahme in die Leber haben. Die rasche Elimination aus dem Blut und die Anreicherung in der Leber, die für PCB's in vivo gefunden wurde (Benthe,1972, s.auch S.49) kann ebenfalls durch die hohe Affinität zu den Gewebsproteinen und -lipoiden erklärt werden.
Die Bildung eines Depots im Plasma bzw. eine nennenswerte Verzögerung der Aufnahme aus dem Blut in Organe und Gewebe, wie sie bei einzelnen Pharmaka beobachtet wurde (Rieder, 1973) ist für polychlorierte Biphenyle und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide nicht anzunehmen, da die Affinität zu den Geweben erheblich größer ist als die Stärke der Proteinbindung.
Die Bedeutung der Proteinbindung dieser Stoffe ist demnach in erster Linie für den Transport im Blut, nicht aber für die Kinetik der Verteilung und Elimination zu sehen.

5. Pharmakokinetik von 2,2'-Dichlorbiphenyl

In Übereinstimmung mit der oben gemachten Annahme stehen die Ergebnisse einer Untersuchung der Verteilungs- und Eliminationskinetik von 2,2'-DCB in vivo.

5.1. Blutspiegelkurve

Nach Verabreichung einer einmaligen Dosis von 1000 mg/kg Körpergewicht p.o. zeigte die Blutspiegelkurve in den ersten zwei Stunden nach der Verabreichung einen steilen Anstieg (Abb.9). Im Anschluß daran wurde eine biphasische Elimination beobachtet.

Die Interpretation der Blutspiegelkurve nach oraler Verabreichung ist etwas problematisch, da zumindest während der ersten Stunden die Eliminationsfunktion von der gleichzeitig verlaufenden Invasion überlagert ist, so daß für den Kurvenverlauf nach Dost (1968) eine zusammengesetzte Funktion im Sinn einer Bateman-Funktion zu erwarten ist. Für die rechnerische Erfassung wurde im vorliegenden Fall eine einfache Exponentialfunktion angenommen. Diese Vereinfachung ist gerechtfertigt, wenn die Invasion mit sehr viel größerer Geschwindigkeit erfolgt, als die Elimination ($k_{in} \gg k_{el}$). Unter dieser Voraussetzung geht die Eliminationskurve nach Beendigung der Invasion in eine einfache Exponentialfunktion über (Dost,1968).
Wie die Darstellung in halblogarithmischem Auftrag (Abb.10) zeigt, erfolgt die Elimination von 2,2'-DCB bereits nach ca. 8 Stunden in Form einer exponentialen Abnahme.
In der ersten Phase der Elimination wurde eine Halbwertszeit von 1.6 Stunden und eine Eliminationskonstante $k = 0.44\ h^{-1}$ gefunden. Dieser rasche Konzentrationsabfall entspricht dem Übertritt in ein "inneres" zweites Kompartiment, das von den Organen gebildet wird.
Nach ca. 24 Stunden ist die Verteilung im Organismus weitgehend abgeschlossen. In der nachfolgenden zweiten Phase der Elimination beträgt die Halbwertszeit 14 Stunden ($k = 0.049\ h^{-1}$), wobei die Elimination durch Metabolisierung und Exkretion in den Vordergrund tritt.
Die Resorption und der Abtransport aus dem Mucosaepithel des Dünndarms wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Vorversuche, die am isolierten Darmsack von Ratten durchgeführt wurden, zeigten, daß diese Methode weniger gut geeignet ist, da wichtige Parameter, wie die Durchblutung der Darmschleimhaut unberücksichtigt bleiben müssen. Nach Shah (1970) erfolgt die Resorption von DDT und Dieldrin im Dünndarm passiv durch Diffusion. Dies gilt mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für die polychlorierten Biphenyle. In vivo werden sie unabhängig vom Chlorierungsgrad zu über 90 % resorbiert (Albro & Fishbein,1972).

Der Vergleich der vorliegenden Untersuchung von 2,2'-Dichlorbiphenyl mit verschiedenen pharmakokinetischen Untersuchungen an anderen polychlorierten Biphenylen zeigt eine weitgehende Übereinstimmung.
Borchard (1974) fand nach intravenöser Verabreichung von Aroclor 1254, wobei das pharmakokinetische Verhalten von 6 Homologen untersucht

wurde, bei Schafen und Schweinen Eliminationskonstanten und -halbwertszeiten in der gleichen Größenordnung wie im vorliegenden Fall.
Bei Beagle-Hunden fand man (Couvillion,1974) eine Eliminationskinetik erster Ordnung für Aroclor 1254.
Die Elimination von 2,4,5,2'5'-Pentachlorbiphenyl nach intravenöser Verabreichung an Ratten (Matthews,1974) zeigte für Blut und Leber einen biphasischen Verlauf, wobei die Blutkonzentration anfangs rasch absank.

5.2. Organkonzentration und Verteilung im Organismus

Neben der Blutspiegelkurve wurde der Konzentrationsverlauf von 2,2'-Dichlorbiphenyl in verschiedenen Organen untersucht (Tab.12). Dabei wurde festgestellt daß die Konzentration in Leber, Niere und Gehirn bereits innerhalb einer Stunde den höchsten Wert erreicht. Innerhalb der ersten 24 Stunden ist der Konzentrationsverlauf durch beträchtliche Schwankungen gekennzeichnet (Abb.11).
Nach längstens 24 Stunden erfolgt die Konzentrationsabnahme in allen Organen mit konstanter Geschwindigkeit in Form einer einfachen Exponentialfunktion.
Im Fettgewebe wird abweichend von den anderen Organen und Geweben infolge der geringeren Durchblutung die Maximalkonzentration erst zwischen 8 und 24 Stunden erreicht. Dieser verzögerte Konzentrationsanstieg wurde bereits früher (Benthe,1972, Matthews,1974) bei PCB's beobachtet.
Nach 168 Stunden enthielt nur noch das Fettgewebe nachweisbare Mengen von 2,2'-Dichlorbiphenyl. Die beträchtliche Streuung, die bei den gleichen Organen von verschiedenen Tieren beobachtet wurde, lässt auf erhebliche individuelle Unterschiede in der Geschwindigkeit der Elimination schliessen, die möglicherweise auf unterschiedliche Stoffwechsellage hindeuten. Im Gegensatz zu dieser erheblichen Streuung betrug die Abweichung vom Mittelwert bei Mehrfachbestimmung einer Organprobe nicht mehr als $\pm$ 10 %.
Im Prinzip entspricht das Verteilungsmuster von 2,2'-DCB demjenigen technischer Gemische (Grant,1971,1971, Curley,1972,Platonow,1973) wobei stets im Fettgewebe und in der Leber die höchsten Konzentrationen gefunden wurden. Die Kinetik der Verteilung und Ausscheidung von PCB-Isomeren und Chlorhomologen zeigt dagegen teilweise größere Unterschiede hinsichtlich der Eliminationshalbwertszeit (Bailey,1972, Borchard,1974).

.3. Maßgebliche Faktoren für die Kinetik der Elimination

Die Unterschiede in der Eliminationskinetik sind beim Vergleich mit Insektiziden, wie Dieldrin (Robinson,1969,Baron,1971) besonders auffallend. Dies gibt Anlaß zu der Frage, welche Faktoren hierfür bestimmend sind.

Die vorliegende Untersuchung deutet darauf hin, daß die Unterschiede in der Wasserlöslichkeit, Proteinbindung und Lipophilie dieser Substanzen eher von untergeordneter Bedeutung sind.
Da die Ausscheidung von polychlorierten Biphenylen (Goto,1973,Chen,1973) ebenso wie von zahlreichen Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden (Wegler, 1970) hauptsächlich in Form von polaren Metaboliten erfolgt, die entweder über die Niere oder mit der Galle in den Darm ausgeschieden werden, liegt die Annahme nahe, daß die Umsatzrate einen wesentlichen begrenzenden Faktor darstellt.
Beispielsweise fanden Matthews (1973) und Chen (1978) keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der verabreichten Dosis von 2,4,5,2'5'-Pentachlorbiphenyl und der Ausscheidungsrate; dagegen wurde nach vorhergehender Hemmung bzw. Induktion der mischfunktionellen Oxidasen in den Mikrosomen der Leber eine deutliche Erniedrigung bzw. Erhöhung der Ausscheidungsrate beobachtet.
Ein weiteres Beispiel für die verzögerte Elimination durch eine niedrige Umsatzrate stellt das Dieldrin dar. Dieldrin wird in der Leber von Säugetieren zu hydrophilen Substanzen umgewandelt (Mörsdorf,1963) und mit der Galle ausgeschieden.
Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von 2,2'-Dichlorbiphenyl unterscheidet sich nur wenig von dem des Dieldrins (tab.11); die beiden Substanzen sind also in Bezug auf ihre lipophilen Eigenschaften sehr ähnlich. Die Halbwertszeit von 2,2'-Dichlorbiphenyl bei Ratten beträgt jedoch nur rund 2 h bzw. 14 h für die schnelle und die nachfolgende langsame Phase der Elimination (Abb. 10) , wogegen für Dieldrin bei Ratten (Robinson,1969) Halbwertszeiten von 1.3 bzw. 10.2 Tagen gefunden wurden.
Die Metabolisierbarkeit und damit auch die Umsatzrate von polychlorierten Biphenylen hängt sowohl vom Chlorierungsgrad (Hutzinger,1972) als auch von der Stellung der Chloratome am Biphenylmolekül ab (Goto,1973, Yoshimura,1973). Baker (1973) vermutet, daß die Chlorierung in p,p'-Stellung einen größeren Einfluß auf die Metabolisierbarkeit und davon

abhängig den Verbleib von PCB's im Organismus hat, als der Chlorierungsgrad.
Mikrosomen aus Kaninchenleber können 4,4'-Dichlorbiphenyl im Gegensatz zu 2,2'-Dichlorbiphenyl nicht umsetzen (Wolff,1975).
Die Lipophilie, ausgedrückt durch den Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ist in erster Linie für die Verteilung der PCB's im Organismus von Bedeutung.
Zwischen der Konzentration von PCB' s im Blut und der Konzentration in den Geweben und Organen stellt sich nach einiger Zeit ein Verteilungsgleichgewicht ein. Die Konzentration in den einzelnen Organen und die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung stehen in engem Zusammenhang mit dem Lipidgehalt und dem Grad der Durchblutung des jeweiligen Organs. Das Konzentrationsverhältnis Leber : Blut sank im vorliegenden Fall innerhalb von 16 Stunden auf einen weitgehend konstanten Wert von 4 :1 gegenüber 18 : 1 nach einer Stunde.
Die Ausscheidung erfolgt vergleichsweise sehr rasch. Nach 7 Tagen war im Fettgewebe nur noch eine Konzentration von 1.1 ppm, entsprechend 0.11 % der verabreichten Dosis nachweisbar. Im Gegensatz dazu fand Chen (1973) am siebten Tag nach der Verabreichung von 2,4,5,2'5'-Pentachlorbiphenyl an Ratten im Fettgewebe noch 19 % einer Dosis, die um den Faktor 1.6×10^2 niedriger war, als die Dosis im vorliegenden Fall.
Die Speicherung von Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden und PCB's, die sowohl im Tierversuch (Hayes,1956, Baron,1970,Curley,1971) als auch unter natürlichen Bedingungen (Acker u. Schulte,1970, Robinson,1970) beobachtet wurde, entspricht der Einstellung eines Fließgleichgewichts zwischen Invasion und Elimination, wie es bei Pharmaka mit exponentialer Elimination nach wiederholter Verabreichung seit langem bekannt ist (Dost,1968). Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der betreffenden Substanzen werden im Fettgewebe die höchsten Konzentrationen erreicht. Die Vermutung, daß die Mobilisierung im Fettgewebe gespeicherter Pestizide durch einen aktiven Transportmechanismus erfolgt (Baron,1970) erscheint aufgrund der oben angeführten Überlegungen nicht begründet.

6. Metabolismus von 2,2'-Dichlorbiphenyl

Die Ausscheidung von 2,2'-Dichlorbiphenyl erfolgt bei Ratten in Form von hydroxilierten Metaboliten (Goto,1973).
In der vorliegenden Untersuchung wurden in Harn und Faeces zwei Substanzen nachgewiesen, bei denen es sich vermutlich um Monohydroxidichlorbiphenyle handelt. Eine nähere Charakterisierung war nicht Gegenstand der Arbeit; in Anlehnung an Goto (1973) wird vermutet, daß es sich um 4-hydroxi-2,2'-Dichlorbiphenyl bzw. 5-hydroxi-2,2'-Dichlorbiphenyl handelt. Dihydroxidichlorbiphenyle wurden nicht beobachtet, jedoch ist ihr Vorhandensein nicht auszuschliessen.
Im Blut und den Organen konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Matthews (1973) und Chen (1973) keine Metaboliten nachgewiesen werden. Die Ausscheidung der Umwandlungsprodukte erfolgt demnach sehr rasch, wobei die biliäre Exkretion von Bedeutung sein dürfte.
Das unterschiedliche Mengenverhältnis der beiden Metaboliten in Harn und Faeces ist möglicherweise durch Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten der beiden Substanzen bedingt. Daneben ist die Möglichkeit einer Metabolisierung in anderen Organen als der Leber, z.B. in der Niere nicht auszuschliessen.
Goto (1973) fand in Kot und Harn von Ratten nach oraler Verabreichung von ^{14}C-markierten isomeren Dichlorbiphenylen bis zu drei Metaboliten. Das Hauptprodukt der Umwandlung von 2,2'-Dichlorbiphenyl war 4-hydroxi-2,2'-Dichlorbiphenyl. Daneben wurden 5-hydroxi-2,2'-Dichlorbiphenyl sowie Dihydroxiprodukte gefunden.
Nach intraperitonealer Verabreichung von 4,4'-Dichlorbiphenyl an Ratten (Hutzinger,1972) wurde nur im Harn ein nicht näher identifiziertes Monohydroxiprodukt gefunden, während große Mengen der unveränderten Substanz mit den Faeces ausgeschieden wurden.
Im vorliegenden Fall wurden in den Faeces nur relativ geringe Mengen an unverändertem 2,2'-Dichlorbiphenyl gefunden. Ob es sich dabei um einen nicht resorbierten Anteil handelt oder ob unverändertes 2,2'-DCB mit der Galle ausgeschieden wurde, kann nicht entschieden werden.

E Zusammenfassung

Zur Erklärung des pharmakokinetischen Verhaltens von polychlorierten Biphenylen und Chlorkohlenwasserstoffinsektiziden im Säugetierorganismus wurden Proteinbindung, Verteilung im Blut sowie die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten , die Aufnahme in die isoliert perfundierte Leber und die Kinetik der Verteilung und Ausscheidung von 2,2'-Dichlorbiphenyl bei Ratten untersucht.

1. Bei der Messung der Proteinbindung unter Verwendung verschiedener Methoden wurde festgestellt, daß diese Stoffe mit Ausnahme von Lindan in Albuminlösungen zu über 90% in gebundener Form vorliegen. Der gebundene Anteil im Plasma beträgt 98 - 99%.

2. Die Bindungskapazität von Serumalbumin und Plasma ist für verschieden hoch chlorierte Biphenyle und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide sehr unterschiedlich. Für den Zusammenhang zwischen der Bindungskapazität und der Löslichkeit in Wasser wurde eine positive Korrelation gefunden.

3. Serumalbumin besitzt die höchste Bindungskapazität, gefolgt von α- und β-Globulinen, während an γ-Globuline nur geringe Mengen von PCB's gebunden werden. Es wird angenommen, daß PCB's und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide, die praktisch wasserunlöslich sind, im Blutplasma überwiegend in gebundener Form transportiert werden.

4. Die Verteilung im Blut wird in erster Linie durch die Proteinbindung bestimmt. 50 - 90% der Gesamtmenge im Blut befinden sich im Plasma und werden mit diesem transportiert. Polychlorierte Biphenyle und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide unterscheiden sich in Bezug auf die Verteilung im Blut nur geringfügig; lediglich bei 2,2'-Dichlorbiphenyl wurde eine signifikante Abweichung des Verteilungsmusters beobachtet.

5. Die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der untersuchten Verbindungen liegen im Bereich zwischen 2×10^4 und 40×10^4 und sind somit sehr hoch. Polychlorierte Biphenyle und Chlorkohlenwasserstoffinsektizide können als extrem lipophile Verbindungen betrachtet werden.

6. Die Kinetik der Aufnahme von 2,2'-Dichlorbiphenyl, 2,5,2'5'-Tetrachlorbiphenyl, Lindan und Dieldrin in die isoliert perfundierte Rattenleber zeigt für die einzelnen Substanzen keine signifikanten Unterschiede.

7. Die Kinetik der Verteilung und Ausscheidung von 2,2'-Dichlorbiphenyl wurde in vivo an Ratten nach oraler Verabreichung untersucht.
Die höchste Konzentration wurde im Fettgewebe gefunden, wobei der Konzentrationsanstieg in diesem Gewebe langsamer erfolgt als in anderen Organen und Geweben.
Die Elimination erfolgt in exponentialer Form. Es wurden zwei Phasen der Elimination gefunden. Die Halbwertszeit im Blut betrug 1.6 bzw. 14 Stunden für die Phase der schnellen bzw. langsamen Elimination.

Die Plasmaproteinbindung stellt sehr wahrscheinlich eine wichtige Transportform für PCB's dar. Für die Aufnahme aus dem Blut und das Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und Geweben hat sie wahrscheinlich keine wesentliche Bedeutung.
Die Eliminationshalbwertszeit wird sehr wahrscheinlich in erster Linie durch Unterschiede in der Metabolisierbarkeit bzw. der Umsatzrate bestimmt, da die Ausscheidung vorwiegend in metabolisierter Form erfolgt.

F Literaturverzeichnis

ACKER,L., E.SCHULTE, Über das Vorkommen chlorierter Kohlenwasserstoffe in menschlichem Fettgewebe u, Humanmilch
Dtsche.Lebensmittel-Rundschau, 66, 385, 1970

ALBRO,P.W., L.FISHBEIN, Intestinal absorption of polychlorinated biphenyls in rats
Bull.Environ.Contam.Toxicol. 8, 26, 1972

ALLEN,J.R., D.H.NORBACK, Polychlorinated biphenyl- and triphenyl-induced gastric mucosal hyperplasia in primates
Science, 179, 498, 1973

ALVARES,A.P.,D.BICKERS,A.KAPPAS, Alteration of hepatic microsomal hemoprotein by polychlorinated biphenyls
Fed.Proc.Fed.Amer .Soc. Exp.Biol. 32, 235, 1973

ANON., Controversy continues over PCB's
Chem.Eng.News, 49, 32,1971

ANON. Polychlorinated biphenyls and the environment
in: Rep.Mo. ITF-PCB-72-1
Hsg.: Interdep.Task Force on PCB'S, Springfield (Virginia,22151)
Nat.Techn.Inform.Serv.US Dept.Commerce, 1972

BAGLEY,G.E.,Identification of polychlorinated biphenyls in two bald eagles by combined GLC-mass-spectrometry
J. of the AOAC, 53, 251, 1970

BAILEY,S. u. P.J.BUNYAN, Interpretation of persistence and effects of polychlorinated biphenyls in birds
Nature, 236, 34, 1972

BAKER,F.D.,B.BUSH, C.TUMASONIS, Persistence of PCB homologs and isomers in the domestic hen and the rat (abstract)
Toxicol.Appl.Pharmacol. 29, 104, 1974

BARON,R.L. u.M.S.WALTON, Dynamics of HEOD (Dieldrin) in adipose tissue of the rat
Toxicol.Appl.Pharmacol. 18, 958, 1971

BAYER AG, Merkblätter für Clophene
Leverkusen,1969

BENNHOLD,H.,H.OTT, in: Handbuch der allg.Pathologie, Bd V/1, Der Stofftransport, hsg. v. F.Buchner, E.Letterer,F.Roulet, Springer, Berlin,Heidelberg, p.165, 1961

BENTHE,H.F.,J.KNOP, A.SCHMOLDT, Aufnahme und Verteilung nach Inhalation polychlorierter Biphenyle
Arch.Toxicol., 29,85, 1972

BICKERS,D.R., A.KAPPAS u.A.P.ALVARES, Differences in inducibility of cutaneous and hepatic drug metabolizing enzymes and cytochrome P-450 by polychlorinated biphenyls and DDT
J.Pharmacol.Exp.Therap., 188,300, 1974

BIROS,F.J., A.C.WALKER u.A.MEDBURY, Polychlorinated biphenyls in human adipose tissue
Bull.Environ.Contam.Toxicol, 5, 317, 1970

BITMAN,J. u.H.C.CECIL ,Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls
J.Agr.Food Chem. 18, 1108, 1970

BLOCK,W.D. u.H.C.CORNISH, Metabolism of biphenyl and 4-chlorbiphenyl in the rabbit
J.Biol.Chem, 234, 3301, 1959

BORCHARD,R.E.,L.G.HANSEN,W.G.HUBER, R.L.METCALF u. M.E.WELBOURN, Pharmacokinetics of Aroclor 1254 components after intravenous administration to swine and sheep
Arch.Environ.Contam.Tox. 2 , 179, 1974

BROADHURST,M.G.,Use and replaceability of polychlorinated biphenyls
Environ Health Persp. 2, 81, 1972

BRUCKNER,J.V.,K.L.KHANNA,H.H.CORNISH, Biological responses of the rat to polychlorinated biphenyls
Toxicol.Appl.Pharmacol., 24, 434, 1973

BÜTTNER,H.u.F.PORTWICH, Bestimmung der Bindung von Sulfonamiden an Serumeiweiß mit der Ultrazentrifuge
Arzneimittelforschung 11, 1113, 1961

BURNSTEIN,M. u.J.SAMAILLE, Sur un dosage rapide du cholesterol lié aux α- et β-lipoprotéins du sérum
Clin.Chim.Acta 5, 609, 1960

CHEN,P.R. u.H.B.MATTHEWS, Metabolism and excretion of 2,4,5,2'5'-pentachlorobiphenyl in the male rat
Abstracts of papers for the thirteenth Annual Meeting of the Society of Toxicology, Washington D.C.
Toxicol.Appl.Pharmacol. 29, 88, 1974

CHEN,T.S. u.K.P.DuBOIS, Studies on the enzyme inducing effect of polychlorinated biphenyls
Toxicol.Appl.Pharmacol. 26, 504, 1973

COULSTON,F. u.F.KORTE (Hsg.) Environmental quality and safety, Vol. I,II, Global aspects of chemistry, toxicology and technology as applied to the environment
Thieme, Stuttgart, 1972, 1973

CURLEY,A., V.W.BUSSE,M.E.GRIMM, R.W.JENNINGS, R.E.LINDER, Polychlrinated biphenyls:Distribution and storage in body fluids and tissue of Sherman rats
Environ.Res. 4, 481, 1971

COUVILLION,J.L., F.L.EARL, E.J.VAN LOON, Toxicodynamics of PCB 1254 in the Beagle dog and miniature swine (Abstract)
Toxicol.Appl.Pharmacol. 29, 104, 1974

DAVIES,B.D., Binding of sulfonamides by plasma proteins
Schience, 95, 78, 1942

DENNES,E.,R.TUPPER,A.WORMALL, The zinc content of erythrocytes and leucocytes of blood from normal and leukaemic subjects
Biochem.J., 78, 578, 1961

DETTLI,L. in: Int. Congress of Chemotherapy, Vol.1, S.641
Stuttgart, 1964

DOST,F.H., Grundlagen der Pharmakokinetik
Thieme, Stuttgart, 1968

DRINKER,C.K., M.F.WARREN,G.A.BENNETT, The problem of possible systemic effects of certain chlorinated hydrocarbons
J.Ind.Hyg.Toxicol., 19, 283, 1937

DUKE,T.W.,J.I.LOWE u.A.J.WILSON, A polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in the water, sediment and biota of Escambia Bay, Florida
Bull.Environ.Contam.Toxicol. 5, 171, 1970

ERNÄHRUNGSBERICHT 1972
(Hsg.) Deutsche Gesellschaft f. Ernährung, Frankfurt/M. , 1973

FERRY,D.G.,D.OWEN, D.L.BALLARD, E.G. MC QUEEN, Pesticides and serum proteins
Proc. of the Univ. of Otago Medical School, 50, 10, 1972

FRANK,H.S. u. M.W.EVANS,
J.Chem.Phys. 13, 507, 1945

FRANZ,J.W.,E.JÄHNCHEN u.J.KRIEGLSTEIN, Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Promazin u.Chlorpromazin
Arch.Pharmak.Exp.Path. 264, 462, 1969

GARDNER,A.M., Polychlorinated biphenyls: Hydroxilated urinary metabolites of 2,5,2'5'-tetrachlorobiphenyl identified in rabbits
Bipchem.Biophys.Res. Comm. 55, 1477, 1973

GARRETSON,L.K. u.A.CURLEY, Dieldrin, Studies in a poisoned child
Arch.Environ.Health, 19, 814, 1969

GOLDBLATT,M.W.,A.F.HENSON,A.R.SOMMERVILLE, Metabolism of bladder carcinogens
Biochem.J. 77, 511, 1960

GOLDSTEIN,A. The interactions of drugs and plasma proteins
Pharmacol.Rev., 1, 120, 1949

GOLDSTEIN,J.A., P.HICKMAN,D.L.JUE, Experimental hepatic porphyria induced by polychlorinated biphenyls
Toxicol.Appl.Pharmacol. 27, 437, 1974

GOTO,M., K.SUGIURA,M.HATTORI,T.MIYAGAWA,M.OKAMURA, Hydroxylation of dichlorobiphenyls in rats
New methods in environ. chemistry and toxicology, Int.Acad. Print. Tokio, p. 299, 1973

GRANT,D.L., W.E.PHILLIPS u.D.C.VILLENEUVE , Metabolism of a polychorinated biphenyl (Aroclor 1254) mixture in the rat
Bull.Environ.Contam.Toxicol. 6, 1o2, 1971

GRANT,D.L.,D.C.VILLENEUVE, K.A.MC CULLY u.W.E.J.PHILLIPS, Placental transfer of polychlorinated biphenyls in the rabbit
Environ.Physiol. 1, 61, 1971

HAHN,J.G., J.KRIEGLSTEIN, G.KRIEGLSTEIN,K.TSCHENTSCHER, Distribution of Chlorpromazine in a simplified blood influenced by various drugs,
Arch.Pharmacol., 278, 35, 1973

HAMMOND,P.P.,I.C.T.NISBET,A.F.SAROFIM,W.H.DRURY,N.NELSON,D.P.RALL
Polychlorinated biphenyls-environmental impact
Environ.Res. 5, 249, 1972

HAYES,W.J., Review of the metabolism of chlorinated hydrocarbon insecticides especially in mammals
Ann.Rev.Pharmacol., 5, 27, 1965

HOFMANN,P., J.KRIEGLSTEIN, E.MUTSCHLER,U.WOLLERT, Die Bestimmung der Eiweißbindung einiger Guanylhydrazone mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration
Arzneimittelforschung, 2O, 681, 1970

HOLDEN,A.V., Source of polychlorinated biphenyl contamination in the marine environment
Nature, 228, 122O, 1970

HORNSTEIN,I.u.W.N.SULLIVAN, The role of chlorinated polyphenyls in improving lindane residues
J.Econ.Entomol. 46, 937, 1953

HUMMEL,J.P., W.J.DREYER, Measurement of protein binding phenomena by gel filtration
Biochim. Biophys.Acta, 63, 53O, 1962

HUSTERT,K.u.F.KORTE, Synthese polychlorierter Biphenyle und ihre Reaktionen bei Uv-Bestrahlungen
Chemosphere, 1, 7, 1972

HUTZINGER,O.,S.SAFE, V.ZITKO, Polychlorinated biphenyls: Synthesis of some individual chlorobiphenyls
Bull.Environ.Contam.Toxicol., 6, 2o9, 1971

HUTZINGER,O.,D.M.NASH, S.SAFE,A.S.DE FREITAS, R.J.NORSTROM , D.J.WILDISH, V.ZITKO, Polychlorinated biphenyls: Metabolic behaviour of pure isomers in pigeons, rats and brook trout
Science, 178, 312, 1972

HUTZINGER,O.S.SAFE, V.ZITKO, Polychlorinated biphenyls
Analabs Res.Notes, 12, No.2, 1972

JÄHNCHEN,E.J.KRIEGLSTEIN,F.KUNKEL,W.J.SAMUELIS, U.WOLLERT, Die Bedeutung der Bindung von Pharmaka an Albumin und Erythrozyten eines Perfusionsmediums der isolierten Rattenleber
Arch.Pharmak., 269, 67, 1971

JÄHNCHEN,E.J.KRIEGLSTEIN,F.KUNKEL,W.J.SAMUELIS, Der hydrophobe Charakter von Phenothiazinderivaten als entscheidende Größe für deren initiale Aufnahme in die isoliert perfundierte Rattenleber
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 266, 363, 1970

JAGER,K.W., Aldrin,Dieldrin, Endrin & Telodrin
Elsevier,Amsterdam,1970

JAKUBOWSKI,T.,L.A.CROWDER, Binding of ^{36}Cl-Dieldrin to suspected target and non-target proteins in vitro
Bull.Environ.Contam.Toxicol. 1o, 217, 1973

JENSEN,S., Report of a new chemical hazard
New Scientist, 32, 162, 1966

JENSEN,S.,A.G.JOHNELS,M.OLSSON,G.OTTERLIND, DDT and PCB in marine animals from Swedish waters
Nature, 224,247, 1969

INTERDEP.TASK FORCE ON PCB'S, Springfield,Virginia, Nat.Techn.Inform. Serv. US DEPT. Commerce, 1972

JOHNSTONE,G.J., D.J.ECOBICHON,O.HUTZINGER,The influence of pure polychlorinated biphenyl compounds on hepatic function in the rat
Toxicol.Appl. Pharmacol. 28, 66, 1974

KESSLER,M.,R.SCHUBOTZ, Die O_2-Versorgung der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
3. Konferenz der Ges. f. Bio. Chemie in Oestrich/Rheingau, 1967
(zit.n. Krigelstein,1969)

KIMBROUGH,R.D.,Toxicity of chlorinated hydrocarbons and related compounds
Arch.Environ.Health, 25, 125, 1972

KIMBROUGH,R.D.,R.E.LINDER,V.W.BUSSE,R.W.JENNINGS, Adenofibrosis in the rat liver
Arch. Environ.Health, 27, 390, 1973

KLOTZ,I.M.,F.M.WALKER,R.B.PIVAN, Binding of organic ions by proteins
J.Americ.Chem.Soc. 68, 1486, 1946

KLOTZ,I.M., The nature of some ion-protein complexes
Cold Spring Harbour Symp. 14, 97, 1949

KOEMAN,J.H.,M.C. TEN NOEVER DE BRAUW, R.H. DE VOS,Chlorinated biphenyls in fish, mussels and birds from the river Rhine and the Netherlands coastal areas
Nature, 221, 1126, 1969

KOLLER,L.D.,J.G.ZINKL, Pathology of polychlorinated biphenyls in rabbits
American J.Path. 70, 363, 1973

KRIEGLSTEIN,J., Über die Wechselbeziehung der Plasma- und Gewebsproteinbindung von Promazin, untersucht an der isoliert perfundierten Rattenleber
Arch.Pharmak. exp. Path. 262, 474, 1969

KRIEGLSTEIN,J., Bestimmungsmethoden, physikochemische Grundlagen und pharmakokinetische Bedeutung der Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln
Arzneimittelforschung 23, 1527, 1973

KRIEGLSTEIN,J., Die Bedeutung der Lipophilie von Arzneimitteln für deren Verteilung im Organismus
Dtsch. med. Wschr., 98, 1509, 1973

KURATSUNE,M.,T.YOSHIMURA, J.MATSUZAKA,A.YAMAGUCHI, Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls
Environ. Health Persp. 1, 119, 1972

KURZ,H., Lipid solubility as an important factor for the penetration of drugs into the liver (Abstract)
Intern.Pharmac. Meeting, Stockholm, 22 - 25 Aug. 1961
Biochem.Pharmacol., 8, 21, 1961

KURZ,H. u.G.FRIEMEL, Artspezifische Unterschiede der Bindung an Plasmaproteine
Arch.Pharmakol.exp. Path. 257, 35, 1967

KURZ,H. Analytische Probleme in der Pharmakokinetik
Symposium im Auftrag der Deutschen Pharmakol.Ges. von M.Kiese u. G.Lange, München, 1.5. 1970

LITTERST,C.L., E.P.LICHTENSTEIN, Effects and interactions of environmental chemicals on human cells in tissue culture
Arch. Environ. Health, 22, 454, 1971

LOWRY,W.H., N.J.ROSEBROUGH,A.L.FARR, R.J.RANDALL, Protein measurement with the Folin phenol reagent
J.Biol. Chem, 193, 265, 1951

MASUDA,Y., R.KAGAWA u.M.KURATSUNE, Polychlorinated biphenyls in carbonless copying paper
Nature, 237, 41, 1972

MATTHEWS,H.B.,J.R.BEND,W.M.ANDERSON, Distribution and kinetics of 2,4,5,2'5'-pentachlorobiphenyl (PCB) in the male rat (Abstract)
Toxicol.Appl.Pharmacol. 29,88, 1974

MEIGS,J.W.,J,J.ALBOM, B.L.KARTIN, Cloracne from unusual exposure to Aroclor
J.Am.Med.Ass. 154, 1417, 1954

MEYER,M.C.; D.E.GUTTMANN, The binding of drugs by plasma proteins
J. Pharm.Sci., 57, 895, 1968

MICK,D.L., K.R.LANG,J.S.DRETCHEN,D.P.BANDERMAN, Aldrin and dieldrin in human blood components
Arch. Environ.Health, 23, 177, 1971

MONSANTO CO. The Aroclor compounds, 1965

MONSANTO CO., Aroclor plasticisers
Techn.Bull. O/PL-306, 1967

MORGAN,J,R., Effects of Aroclor 1242 (a polychlorinated biphenyl) and DDT on cultures of an alga,protozoan, Daphnid, Ostracod and Guppy
Bull.Environ.Contam.Toxicol., 8 , 129, 1972

MOSS,J.A., D.E.HATHWAY, Transport of organic compounds in the mammal
Biochem.J., 91, 384, 1964

MÜLLER,W.F.KORTE, Chemie in unserer Zeit, 7, 112, 1973
zit.n. Müller, 1974

MÜLLER,W.H.ROHLEDER,W.KLEIN u. F.KORTE, Modellstudie zur Abfallbeseitigung: Verhalten repräsentativer xenobiotischer Substanzen bei der Müllkompostierung
GSF-Bericht Ö 104, Hsg. Ges. f. Strahlen- u. Umweltforschung, München, 1974

MURAI,Y u.Y.KUROIWA, Peripheral neuropathy in chlorobiphenyl poisoning
Neurology, 21, 1173, 1971

NÉMETHY, G., H.A.SCHERAGA, J. Chem.Phys., 36, 3401, 1962
zit.n. Scholtan,W., Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin u.Ribonukleinsäure, Arzneimittelforschung 18, 305, 1968

NICHOL,L.W., D.J.WINZOR, The determination of equilibrium constants from transport data on rapidly reacting systems
J.Phys.Chem. 68, 2455, 1964

NIMMO,D.R.,P.D.WILSON,R.R.BLACKMAN u. A.J.WILSON, Polychlorinated biphenyl absorbed from sediments by fiddler crabs and pink shrimp
Nature, 231, 50, 1971

NISBET,I.C.T. u.A.F.SAROFIM, Rates and routes of transport of PCB's in the environment
Environ.Health.Perspect. 1, 21, 1972

NISHIZUMI,M.,Light and electron microscope study of chlorobiphenyl poisoning
Arch.Environ.Health, 21, 620, 1970

ODSJÖ,T. PCB in some Swedish terrestrial organisms
in: PCB-Conference II, 45, Hsg. : National Swedish Environ. Prot. Board, Stockholm, 14.12.1972

OLSSON,M.,S.JENSEN, L.RENBERG, PCB's in coastal areas of the Baltic
in: PCB-Conference II, 59, Stockholm, 1972

PEAKALL,D.B.,J.L.LINCER, Another long-life widespread chemical in the environment
Bioscience, 20, 958, 1970

PECK,S.M., Dermatitis from cutting oils, solvents and dielectrics including chloracne
J.Am.Med.Ass. 125, 190, 1944

PLATONOW,N., N.Y.CHEN, Transplacental transfer of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) in a cow
Vet.Rec., 92, 69, 1973

PENNING, C.H., Physical characteristics and commercial possibilities of chlorinated diphenyl
Ind. Eng. Chem. 22, , 1180, 1930

PRESTT,D.J., N.W.MOORE, Polychlorinated biphenyls in wild birds in Britain and their avian toxicity
Environ.Poolut. 1, 3, 1970

RAAFLAUB,J., Über die Beziehungen zwischen der Lipidlöslichkeit von Pharmaka und ihrem pharmakokinetischen Verhalten
Experientia, 26, 457, 1970

RADOMSKI,J.L., Human pesticide blood levels as a measure of body burden and pesticide exposure
Toxicol.Appl.Pharmacol. 20, 175, 1971

RADOMSKI,J.L.,E.ASTOLFI,W.B.DEICHMANN, A.A.REY, Blood levels of organochlorine pesticides in Argentina: occupationally and non-occupationally exposed adults, children and newborn infants
Toxicol.Appl.Pharmacol., 20, 186, 1971

RAUEN,H.M. (Hsg.) Biochem. Taschenbuch, Bd. II.
Springer Verlag, 1964

REYNOLDS,L.M., Pesticide residue analysis in the presence of PCB's
Residue Rev. 34, 27, 1971

RICHTER,E., Untersuchungen über die Ausscheidung polychlorierter Biphenyle in das Hühnerei und ihre Verteilung zwischen Weißei und Dotter
Diss., Inst. f. Pharmakol.,Toxikol. u.Pharmazie, Universität München,1974

RIEDER,J., Protein binding of drugs
Lecture given at the III.European Workshop on Drug Metabolism
Tübingen, 1. - 6. 10. 1972

RISEBROUGH,R.W.,R.J.HUGETT,J,J.GRIFFIN,E.D.GOLDBERG, Pesticides: transatlantic movement in the northeast trades
Science 159, 1233, 1968

RISEBROUGH,R.W.,P.RIECHE,D.B.PEAKALL,S.G.HERMAN, M.N.KIRVEN, Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem
Nature, 220, 1098, 1968

ROBINSON,J., ROBERTS,M., M.BALDWIN, A.I.T.WALKER, The kinetics of HEOD (Dieldrin) in the rat
Food Cosmet.Toxicol., 7, 317, 1969

ROBINSON,J.,Persistent Pesticides
Ann.Rev.Pharmac. 10, 353, 1970

ROSEN,A.A. u.H.F.KRAYBILL, Organic pesticides in the environment
Adv. in Chemistry, Ser. 60, 1966
Amer.Chem.Soc. ,Washington

SAHYUN,M.R.V., Enthalpy of binding of aromatic amines to bovine serum albumin
Nature, 203, 1045, 1964

SAHYUN,M.R.V., Binding of aromatic compunds to bovine serum albumin
Nature, 209, 613, 1966

SANDERS,H.O. u.J.H.CHANDLER, Biological magnification of a polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) from water by aquatic invertebrates
Bull.Environ.Contam.Toxicol., 7, 257, 1972

SCHMIDT,H.,SCHULTZ,G.. Einwirkung von Fünffach-Chlorphosphor auf das γ- diphenol
Ann.Chem. 207 , 338, 1881

SCHMIDT,T.T.,R.W.RISEBROUGH, F.GRESS, Input of polychlorinated biphenyls into California coastal waters from urban sewage outfalls
Bull.Environ.Contam.Toxicol., 6, 235, 1971

SCHOLTAN,W., Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonukleinsäure
Arzneimittelforschung, 18, 505, 1968

SCHOOR,W.P., In vivo binding of p,p'-DDE to human serum proteins
Bull.Environ.Contam.Toxicol., 9, 70, 1973

SELENKA,F., Ergebnisse über die Verunreinigung von Oberflächengewässern mit polychlorierten Biphenylen
in: Schr.Reihe Ver.Wasser-,Boden-,Lufthyg., Berlin-Dahlem, 37, 113,1972

SHAH,A.H.,F.E.GUTHRIE,Penetration of insecticides through the isolated midgut of insects and ammals
Comp.Gen.Pharmac. 1, 391, 1970

SISSONS,D.u.D.WELTI, Structural identification of polychlorinated biphenyls in commercial mixtures by gas-liquid-chromatography, nuclear magnetic resonance and mass spectrometry
J.Chromatogr., 60., 15, 1971

SKRENTNY,R.,R.W.HENKEN, H.W.DOROUGH, Silo sealents as a source of polychlorobiphenyl (PCB) contamination of animal food
Bull. Environ.Contam.Toxicol., 6, 409, 1971

SÖDERGREN,A.,B.SVENSSON, S.ULFSTRAND, DDT and PCB in south Swedish streams
Environ.Pollut. 3, 25, 1972

STANOVICK,R.P., S.I.SHAHIED,E.MISSAGHI, Determination of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1242) migration into food types
Bull.Environ.Contam.Toxicol. 10, 101, 1973

TARRANT,K.R.,J.O.G.TATTON, Organochlorine pesticides in rainwater in the British Isles
Nature, 219, 725, 1968

VEITH,G.D. u.G.F.LEE, PCB's in fish from the Milwaukee region
Toronto, Proc. 14th Conf. Great Lakes Res. 1971

VILLENEUVE , D.C., D.L.GRANT, W.E.J.PHILIPS, M.L.CLARK,D.J.CLEGG, Effects of PCB administration on microsomal enzyme activity in pregnant rabbits
Bull.Environ.Contam.Toxicol. 6, 120, 1971

VOERMAN,S., Distribution ratio of some chlorinated hydrocarbon insecticides between hexane and water
Bull.Environ.Contam.Toxicol., 4, 64, 1969

VOS,J.G.,J.H.KOEMAN,H.L.VAN DER MAAS, M.C.TEN NOEVER DE BRAUW,R.H.DE VOS
Identification and toxicological evaluation of chlorinated dibenzofuran and chlorinated naphthalene in two commercial polychlorinated biphenyls
Food Cosmet.Toxicol., 8, 625, 1970

VOS,J.G. u. R.B.BEEMS, Dermal toxicity studies of technical polychlorinated biphenyls and fractions thereof in rabbits
Toxicol.Appl.Pharmacol., 19, 617, 1971

VOLLMANN,H. in: Ullmann, Enzyklopädie der technischen Chemie, Urban u. Schwarzenberg, München, Bd.V, p. 475, 1954

WEIKEL,J.H., E.P.LANG,R.TOMCHICK, Ion movement across the rabbit erythrocyte membrane as affected by chlorinated insecticides
Arch.Int.Pharmacodyn. 113, 261, 1958

WEGLER,R., Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel Vol.I,II, Springer, 1970

WITZGALL,H.,H.BOYENS, Die Bedeutung der Bindung an Albumin, Körperzellen und Bakterien für Pharmakodynamik und Wirkung von Arzneistoffen
Arch. Int. Pharmacodyn. 148, 511, 1964

Wolff, T., Persönl.Mitt., 1975

YOBS,A.R., Levels of PCB's in adipose tissue of the general population of the nation
Environ.Health Perspect. 1, 79, 1972

YOSHIMURA, H. u.M.OSHIMA, Studies on the tissue distribution and elimination of several components of KC-400 (chlorobiphenyl) in mice
Fukuoka Acta med. 62, 5, 1971

YOSHIMURA,H.,H.YAMAMOTO, S.SAEKI, Metabolic studies on PCB's II. Metabolic fate of 2,4,3'4'-tetrachlorobiphenyl in rats
Chem . Pharm. Bull. 21, 2231, 1973

LEBENSLAUF

Geburtstag:	26.5.46
Geburtsort:	München
Eltern:	Martha Deml, geb. Zacharias
	Hans Deml, Dipl.Landwirt
Schulausbildung:	Besuch der Volksschule am Bayernplatz, München, 1952 - 1956, dann Übertritt in das Alte Realgymnasium München
	Abitur 1965
Studium:	ab Wintersemester 1965/66 Studium der Biologie und Chemie an der Universität München
Staatsexamen f. das Lehramt an Gymnasien :	Herbst 1970 in München
Beginn der Doktorarbeit :	Februar 1972